

(Dall'Istituto di Zoologia e Anatomia comparata della R. Università di Milano.)

## I FENOMENI CROMOSOMICI NELLE CELLULE SOMATICHE DI *ARTEMIA SALINA* LEACH.

Di

CLAUDIO BARIGOZZI.

Con 20 figure nel testo.

(Eingegangen am 24. September 1941.)

### Introduzione.

Una serie di osservazioni casuali compiute in occasione di ricerche precedenti (BARIGOZZI, 1940), mi aveva posto sott'occhio alcune singolari strutture dei nuclei delle cellule appartenenti ad organi e a tessuti diversi in *Artemie* diploidi e poliploidi. Più tardi un esame della bibliografia sulle variazioni della forma e della struttura dei cromosomi in parti diverse dell'organismo e sulla struttura dei nuclei in riposo, mi ha convinto che ciò che si conosce a questo proposito è così poco, da giustificare una ricerca sistematica su vari tessuti ed organi negli stadi dello sviluppo e nell'adulto, in qualsiasi specie nella quale sia possibile l'applicazione delle tecniche appropriate per lo studio dei cromosomi.

È opportuno delineare subito quali siano le conoscenze attuali circa le variazioni della forma e della struttura dei cromosomi in tessuti diversi dello stesso organismo, per poter indicare poi con maggior chiarezza le finalità di questa ricerca.

### A. Nuclei in riposo.

Nel nucleo in riposo oggi si riconosce l'esistenza di un sistema di cromosomi filamentosi con andamento sinuoso a spirali<sup>1</sup> allentate ad eccezione dei cromosomi eterocromatici, che possono però essere condensati in forma di blocchi (procromosomi o cromocentri) senza mostrare veri avvolgimenti ad elica.

I cromosomi dei nuclei in riposo sono poverissimi o privi di matrice, e lasciano scorgere la serie di granuli allineati di cui constano (i cromomeri). Tra i diversi AA. non vi è accordo sulla semplicità o molteplicità di struttura di questi filamenti: secondo DARLINGTON (1935), MATHER e STONE (1933), WHITE (1937) ed altri, essi sarebbero semplici, cioè durante l'anafase ogni cromosoma sarebbe semplice (durante l'anafase cioè cromosoma equivarrebbe a cromatidio) e tale si manterrebbe durante

<sup>1</sup> La denominazione di spirale non è veramente esatta e sarebbe più corrispondente alla nomenclatura usata in Geometria valersi del termine di «elica», come già nota STRAUB (1938). Però ormai la parola *spirale* è entrata nell'uso.

la telofase e gran parte del riposo, fino allo sdoppiamento all'inizio della profase successiva. Invece altri Autori (e sono forse la maggioranza) ritengono che ogni cromosoma in riposo sia costituito da più filamenti: la struttura più complessa sarebbe quella delineata secondo i criteri di NEBEL e RUTTLE (1937), i quali riconoscerebbero in ogni cromosoma due cromatidi, in ciascuno dei quali si distinguerebbero due mezzi cromatidi già nella anafase e nella telofase, cioè per tutta la durata del riposo nucleare; secondo NEBEL e RUTTLE pertanto ogni cromosoma durante il riposo consterebbe di quattro filamenti elementari; a questa affermazione si ricollegano anche le osservazioni di KUWADA (1939).

Decidere oggi quale delle due tesi sia più fondata è impossibile: però deve essere tenuto in considerazione che DARLINGTON lavorò su *Fritillaria*, mentre gli altri prevalentemente prescelsero il gen. *Tradescantia* come oggetto delle proprie indagini: la discrepanza potrebbe perciò essere determinata dal materiale differente.

La struttura del nucleo in riposo, concepita come un sistema di filamenti, si basa su osservazioni limitate a relativamente poche specie botaniche, e sebbene la sua validità generale sia sostenuta da prove sperimentali di grande portata, come per es. le mutazioni cromosomiche indotte con radiazioni durante il riposo nucleare (vedere a questo proposito un esame completo in: DARLINGTON, 1937) di solito, specialmente in materiale zoologico fissato e colorato, i filamenti cromosomici si vedono male. Ciò nonostante, le strutture nucleari a tipo reticolare, alveolare, o granulare, devono essere interpretate — per unanime giudizio di tutti gli Autori moderni — come artefatti. Solo SHARP ancora recentemente (1929) sostiene l'esistenza di anastomosi tra i filamenti cromosomici in *Vicia* durante il riposo nucleare, ciò che condurrebbe ad una struttura reticolare. Più ampi dettagli su questo problema si trovano nel Trattato di GEITLER (1938), nella rassegna sintetica di STRAUB (1938), e in quella di KUWADA (1939). Con le vecchie concezioni succennate è caduta anche quella del filamento continuo o spirema (come si deduce per es. dall'esistenza di cromosomi ad anello), tranne che per il caso isolato di *Icerya purchasi* (HUGHES-SCHRADER, 1927).

Dobbiamo però distinguere, dai diversi gradi di visibilità della struttura reale filamentosa che possono aver dato origine ad artefatti o false interpretazioni, alcune vere eccezioni, che sono oggi poche e isolate, probabilmente perché moltissime specie non sono ancora state esaminate. I casi sicuramente discordanti da quanto si disse fin qui sono oggi due: 1° i nuclei di tipo salivare nei Ditteri; 2° i nuclei poliploidi in *Gerris lateralis* e specie congeneri, studiate da GEITLER (1939). I primi sono (da quello che si sa dopo le ricerche di BAUER, 1935) fasci di filamenti elementari paralleli, secondo lo stesso BAUER privi di matrice e con scarsissima spiralizzazione, sebbene dati recentissimi (PAINTER, 1941) facciano pensare all'esistenza di matrice sopra i singoli filamenti. Caratte-

ristiche principali per i cromosomi salivari sono: a) le parti eterocromatiche costituite da masse di cromomeri grossolani (BAUER, 1936) più o meno riuniti in cromocentri, b) i cromomeri ben visibili, in modo che quelli che nei singoli cromonemi vengono a trovarsi allo stesso livello, costituendo le bande trasversali caratteristiche, c) le strozzature e i rigonfiamenti che caratterizzano le singole parti del cromosoma, d) la loro buona fissabilità e, spesso, buona visibilità a fresco, come di solito non avviene per i normali nuclei in riposo.

È noto che queste caratteristiche strutturali non sono esclusive dei nuclei delle cellule delle ghiandole salivari, ma si riscontrano altresì (sebbene con minore chiarezza) in cellule dell'ovario (*Lucilia caesar*, BAUER, 1938) e in svariati altri organi di Ditteri (BERGER, 1938), come i tubi malpighiani, l'intestino (cellule dell'epitelio) ecc.

Quanto ai cromosomi-specialmente in condizioni di poliploidismo somatico-osservati da GETTLER in alcuni generi di Rincoti (p. es. in *Gerris lateralis*), si nota, al contrario, un permanere dell'aspetto mitotico anche durante il riposo nucleare. Ciò che si osserva è una perdita della nettezza di contorni, per cui la massima chiarezza è mantenuta dalle masse eterocromatiche (cromosomi X e Y) che spiccano su tutto il resto dell'assetto per una contrazione più forte del materiale di cui constano. L'esame compiuto da GETTLER (1939) si riferisce ai seguenti organi o porzioni di organi: setti testicolari, tubi malpighiani, enociti, ghiandole salivari, epitelio intestinale. GETTLER nota anche qualche differenza tra l'aspetto dei cromosomi dei setti testicolari e quelli dei tubi malpighiani.

### B. Mitosi.

I fenomeni cromosomici della mitosi vengono esposti oggi principalmente secondo due teorie: quella che fa capo a DARLINGTON, e quella che, seguita dalla maggior parte degli AA., è stata schematizzata da STRAUB (1938). È utile ai nostri fini immediati di esporre ambedue le maniere di interpretare il fenomeno, contrapponendo i due schemi:

secondo DARLINGTON

**Profase:** i cromosomi cominciano a divenire visibili come filamenti sinuosi (le sinuosità sono i residui delle spirali della mitosi precedente) indivisi; poi le sinuosità si distendono, il cromosoma si spacca longitudinalmente nei due cromatidi che assumono una struttura a spirale, che però non si vede direttamente perchè al di sotto della visibilità (spirali molecolari).

secondo STRAUB

I cromosomi compaiono, in fase estremamente iniziale, come già divisi, sinuosi, che si distendono per assumere una nuova spiralizzazione visibile (fase spirale); queste spiralizzazioni, dopo aver raggiunto un massimo, si distendono di nuovo parzialmente.

Secondo ambedue le maniere di descrivere il fenomeno, alla fine della profase un forte ammassarsi della sostanza nello strato superficiale (matrice) del cromatidio rende a poco a poco invisibile la struttura interna e insieme più netta la forma esterna del cromosoma.

I cromatidi divengono più grossi, tozzi e corti; l'accorciamento apparente è determinato da una spiralizzazione visibile, che viene detta spirale minore, avvolta in una spirale più grande, detta spirale maggiore.

I cromatidi vanno incontro ad una nuova spiralizzazione a spire più ampie.

**Metafase:** si raggiunge a questo punto il massimo raccorciamento per avvicinamento delle spirali.

#### Piastra equatoriale.

Il cromosoma è diviso in due cromatidi.

I cromosomi sono formati da due elementi, di cui ciascuno comprende due cromatidi (o quattro mezzi cromatidi).

**Anafase:** i cromatidi muovono verso i poli.

Le coppie di cromatidi (o i quartetti di mezzi cromatidi) muovono verso i poli.

**Telofase:** i cromatidi o filamenti indivisi allentano la spiralizzazione, rimanendone però molte tracce (spirali residue).

I cromatidi o i mezzi cromatidi allentano rapidamente le spirali che rimangono come sinuosità irregolari.

Per spiegare queste discrepanze ripetiamo che il primo schema (sec. DARLINGTON) tiene soprattutto conto delle osservazioni compiute su *Fritillaria*, mentre gli altri tengono conto di *Tradescantia*, *Gasteria* e altre piante. L'esistenza di mezzi cromatidi è sostenuta soprattutto da NEBEL e RUTTLE (1937) e da KUWADA (1939), ma non è ritenuta come sicuramente dimostrata da STRAUB. Infine, per quello che si riferisce alla matrice, specialmente KUWADA distingue un rivestimento proprio dei cromatidi e uno generale o superficiale del cromosoma, sostenendo l'esistenza dei due cromatidi già nella anafase, come NEBEL e RUTTLE. Veniamo ora alla endomitosi. Questa, è noto, consta di un raddoppiamento dei cromosomi senza raddoppiamento nucleare e non comporta perciò nè formazione del fuso, nè piastra equatoriale, nè, infine, una vera anafase. Il fenomeno della endomitosi viene postulato ogni volta che si incontrano nuclei poliploidi in individui diploidi; siccome in questi ultimi anni sono stati descritti moltissimi esempi di tali nuclei, tanto nelle Piante quanto negli Animali, dovrebbe trattarsi di un fenomeno frequente.

Però solo a GEITLER forse è occorso (in alcune specie di Rincoti) di poterne osservare gli stadi con sicurezza, mentre forme interpretabili come tali, ma meno nette, vide D'ANCONA (1939) nel parenchima epatico di Mammiferi. In nuclei di tipo salivare, l'endomitosi è chiarissima per le cellule di rivestimento dell'ovario in *Lucilia caesar* (BAUER, 1938) e, sebbene difficili da leggere, nelle ghiandole salivari e nelle cellule nutrici dell'ovario dei Ditteri in genere (PAINTER e GRIFFEN, 1937, PAINTER e REINDORP, 1939). In questo ultimo caso trattasi di endomitosi particolarissime, estremamente abbreviate che appena si possono notare. In *Gerris*, al contrario, il fenomeno decorre come in una mitosi normale, con mancanza di fuso, piastra equatoriale e una anafase tipica: però il materiale non si presta ad una analisi minuta della spiralizzazione.

Da questa esposizione succinta risulta che i tratti essenziali del fenomeno mitotico, per quello che concerne il comportamento dei cromosomi, è stato chiaramente messo in luce con alcune controversie, derivanti, in parte almeno, dal fatto che è stato preso in considerazione materiale diverso da Autori differenti. Se si tiene conto delle circostanze che le specie che hanno servito alle indagini sono ascrivibili a pochissimi generi (*Tradescantia*, *Fritillaria*, *Gasteria* e alcuni altri) appartenenti al regno vegetale, è naturale presumere che, studiando altre specie, anche animali, possano risultare varianti degne di interesse, oppure una riprova della portata generale delle osservazioni compiute sulle Piante. Quanto si dice per le mitosi vere e proprie vale ancor più per l'endomitosi, che, se è ben conosciuta per *Lucilia* e *Gerris*, merita di essere approfondita ancora in altre specie. Un problema poi che è sempre rimasto nell'ombra è quello delle variazioni di forma e di struttura che i cromosomi presentano in diversi tessuti ed organi: lo schema della struttura del nucleo in riposo e della mitosi, infatti, viene desunto da osservazioni compiute sui tessuti più facili ad essere studiati, provenienti dalle gonadi, dalle ghiandole salivari, dai tubi malpighiani, dagli enociti, dagli apici radicali, ecc., ove è frequente la riproduzione nucleare con o senza moltiplicazione cellulare. Manca ancora una ricerca sistematica della varianti del fenomeno nelle varie parti dell'organismo, anche se tutto lascia presumere che tali varianti esistano. Infatti la struttura di tipo «salivare» è sufficientemente istruttiva a questo proposito, e alcuni spunti risultano chiari dal quanto dice GEITLER (1938).

Queste argomentazioni mi hanno indotto a considerare come un buon materiale di studio *Artemia salina* LEACH. dove ho potuto riscontrare quanto segue:

1° I vari tessuti, ed anche gli organi interni, permettono l'applicazione della tecnica allo schiacciamento, quando vengano trattati con acetocarmio.

2° Le mitosi sono frequentissime nel *Nauplius*, e le endomitosi negli stadi successivi di sviluppo (*Metanauplius*, giovane) e nell'adulto.

Ho pertanto istituito il seguente piano di ricerche:

*analizzare la morfologia e la struttura dei cromosomi durante il riposo nucleare, la mitosi e l'endomitosi nei vari stadi di sviluppo nei diversi tessuti appartenenti agli organi principali.*

I risultati verranno poi discussi, mettendoli in relazione tanto con quelli raggiunti lavorando con altro materiale, quanto col problema dei fattori determinanti la spiralizzazione cromosomica.

### Materiale e Tecnica.

I *Nauplius* e i vari stadi di sviluppo furono ottenuti facendo schiudere in laboratorio uova durature di *Artemia* diploide di Cagliari e tetraploide di Portorose, la prima cioè con 42, la seconda con 84 cromosomi. Essendo già stata risolta la questione del numero in una ricerca preliminare (per le *Artemie* di Cagliari non ho fatto che controllare rapidamente le osservazioni di ARTOM, 1906), non ho tenuto conto altro che della forma e della struttura dei cromosomi; a questo scopo, il numero elevato mi è stato di vantaggio, perché mi ha permesso di compiere molte osservazioni in una sola cellula. La tecnica adoperata prevalentemente è stata quella dell'acetocarminio.

Ho adoperato per la preparazione la formula che si impiega usualmente; per i *Nauplius* il tempo ottimo di colorazione è di circa un'ora e un quarto, o un'ora e mezza. Con tempi un po' più lunghi si colorano bene anche *Melanauplius* interi. Giovani e adulti sono stati prima dissecati e divisi nei vari organi, mantenendo un tempo di permanenza in carminio di un'ora e tre quarti circa. Sono stati fatti preparati permanenti in gran copia, mediante montaggio in euparal.

Ho eseguito anche alcuni preparati in sezioni di 5—7  $\mu$  colorati con ematossilina ferrica, dopo fissazione in Bouin, ma il forte impieciolimento e la colorazione intensa tolgono ogni possibilità all'osservazione della struttura cromosomica.

Per singoli punti della ricerca (colorazione dei nucleoli) è stata usata la reazione di FEULGEN, dopo fissazione in Bouin.

Nel complesso sono stati preparati circa ottocento esemplari.

### Osservazioni.

#### 1° La forma e la struttura dei cromosomi nelle cellule del *Nauplius*.

Come è noto, il primo stadio di *Artemia salina* appena sgusciata è un tipico *Nauplius*. In esso si distinguono due tipi di cellule, perché, accanto a cellule epiteliali, aventi tutte la stessa struttura nucleare e tutte sede di frequenti mitosi (in un *Nauplius* appena schiuso si contano in media 25—30 mitosi nelle diverse fasi) con 42 o 84 cromosomi a seconda del grado di poliploidia, si notano alcuni elementi muscolari con poco evidente striatura, con nuclei grandissimi, altamente poliploidi.

In *Artemia salina* si riscontra dunque il poliploidismo somatico fin dalla schiusura dell'uovo, inizialmente a carico esclusivamente degli elementi muscolari, che sono collocati nel secondo e terzo paio di appendici. Dopo circa 6 o 7 ore cominciano a comparire delle endomitosi nelle cellule di rivestimento della regione cefalica. Verso la fine dello stadio (generalmente nel giorno successivo alla schiusura) si notano rare endomitosi anche in altre regioni del corpo.

Descriverò separatamente i fenomeni cromosomici nelle cellule dove avvengono mitosi (cellule di- e tetraploidi), ed in quelle dove esse non avvengono (elementi muscolari). Le endomitosi, essendo più frequenti nel *Metanauplius*, verranno descritte più avanti.

#### A. Cellule a numero cromosomico base.

1° *Anafase*: Ho potuto osservare l'anafase relativamente poche volte, probabilmente perchè essa si svolge con grande rapidità; perciò non mi è stato possibile scorgere quale struttura presentino i cromosomi durante questo stadio. La loro forma tozza e la loro forte contrazione, che verrà notata più avanti a proposito della metafase, si mantiene durante tutta questa parte della mitosi. Per questo motivo non è possibile vedere se ogni elemento che si dirige verso un polo del fuso sia semplice o doppio.

2° *Telofase*: Anche questo stadio è di difficile osservazione e non permette di affrontare alcun problema della struttura cromosomica: rimane perciò ignoto se ogni cromosoma contenga uno o due cromatidi. La matrice sembra perdere di coerenza, in modo che i contorni tra i cromosomi diventano incerti. I cromosomi sono assai avvicinati, e perdono fortemente di colorabilità. Che il processo si svolga in brevissimo tempo risulta dal fatto che non si osservano questi stadi di passaggio tra i nuclei tipicamente telofasici e quelli nel riposo nucleare di cui si dirà ora. Si è indotti a pensare che la despiralizzazione sia offuscata dalla matrice abbondante.

3° *Nucleo in Riposo*: i nuclei non schiacciati sono quasi sferici e appena lievemente colorabili. Nelle Artemie diploidi si osserva un nucleolo pallido tondeggianti od ovalare, talvolta grossolanamente angoloso. Nelle Artemie tetraploidi se ne contano due, qualche volta più o meno parzialmente fusi in uno solo, particolarmente voluminoso. La frequenza con cui si presenta la fusione dei nucleoli in cellule dove non si abbia poliploidismo somatico è circa del 16%. Se si volesse attribuire grande importanza al numero dei nucleoli, bisognerebbe concludere che si tratta di cellule esaploidi, ma non v'è altro argomento in favore di questa interpretazione.

Mediante la reazione di FEULGEN ho tentato di chiarire se col nucleolo si associ un cromocentro, cioè un gruppo di porzioni eterocromatiche. Ritengo che questo sia caratterizzato da una struttura a granuli grossi o addirittura a zolle di cromatina, e che la distinzione tra cromocentro e nucleolo può essere possibile, anche non accogliendo l'affermazione molto recisa di DARLINGTON (1937) che il nucleolo non contiene acido timonucleinico; affermazione del resto che sembra smentita da un recentissimo lavoro di CASPERSSON (1941). Prospettando dunque una scarsa reattività col metodo di FEULGEN del vero nucleolo a struttura non granulare, e una reazione intensa per il cromocentro a struttura granulare (cromomera),

osservai con tale metodo che attorno all'area del nucleolo, che quasi non si vede, ci sono alcuni grandi granuli irregolari (forse addirittura piccole porzioni di cromosomi) che sembrano costituire un piccolo cromocentro mentre il nucleolo ovoidale amorfo è pallidissimo.

Nei nuclei ben schiacciati, l'analisi del contenuto dimostra che i singoli cromosomi sono sottilissimi filamenti con notevoli spiralizzazioni rilasciate non del tutto irregolari (fig. 1), che presentano a distanze ineguali dei minutissimi cromomeri di dimensioni così ridotte da non essere spesso neppure identificabili con certezza. Qualche volta i filamenti appaiono sicuramente doppi.

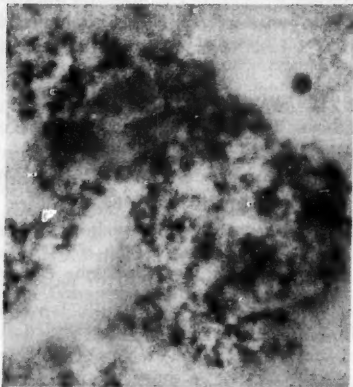


Fig. 1. Nucleo in riposo di cellula tetraploide in *Nauplius* tetraploide. Si notano i cromosomi a spirali rilasciate. (Ingrandimento circa 1500 volte.)

4° Profase: Il primo accenno della profase si riscontra in una diminuzione delle spire e una maggiore colorabilità dei filamenti cromosomici. Già a questo punto non si riesce a distinguere più alcuna traccia dei cromomeri (vedi fig. 5, n. 2).

Lo stadio successivo è assai tipico e può essere definito come segue: l'andamento generale del cromosoma è a lievi ondulazioni, interpretabili come le spirali residue (secondo il concetto di DARLINGTON) dello stadio di riposo. I cromosomi, ben visibili e colorabili, sono avvolti in piccole spire assai numerose, delle quali è difficile procedere ad un conteggio, anche perché alcune di esse sono ben marcate, ed altre meno. Ogni cromosoma è diviso nei due cromatidi, come è naturale dal momento che questo fatto è già stato osservato nello stadio precedente. Tuttavia la fessura mediana non è facile da osservare perché i due cromatidi sono tra loro molto avvicinati; per di più spesso sembrano (anche se ciò è difficile da vedere chiaramente) avviticchiati l'uno sull'altro.

Questo complesso di caratteri permette di identificare questo stadio con lo «stadio spirale» di SHARP (1929) visto nella *Tradescantia*, con lo stadio delle spirali cromosomiche (*Chromosomenspiralen*) pure osservato nella *Tradescantia* (BÉLAÏ, 1929), con la «profase a spirali» (*Spiralprophase*) di STRAUB (1939), che noi potremmo chiamare delle *spirali profasiche*.

A proposito di questo momento della mitosi possiamo rilevare ancora due fatti:

1° I cromosomi sono alcuni lunghi, altri brevi, come si rileva dalla microfotografia (fig. 2). I più lunghi raggiungono  $17\mu$ , i più corti sono meno lunghi di  $2,0\mu$ . Se calcoliamo la lunghezza dei filamenti durante la fine del riposo nucleare, troviamo una lunghezza di circa  $22,0\mu$ , che vale naturalmente solo come approssimata perché le sinuosità rappre-



Fig. 2. Spirali profasiche. (Ingrandimento circa 1500 volte.)

sentano una forte causa di errore. Il numero delle spire è difficile da contare: negli elementi più lunghi supera la quindicina, molti ne hanno da 8 a 12.

2° In alcuni casi si osserva un tratto chiaro senza spirallature, che rappresenta il punto di attacco al fuso: esso è posto talvolta circa a metà del cromosoma (cromosomi atelomitici), tal'altra *quasi* ad un estremo (cromosomi telomitici). Se si prescinde dai cromosomi più piccoli, nei quali non è possibile compiere un'osservazione precisa, dovrei ritenere che non esistono in questa specie (come del resto sembra essere in generale) attacchi al fuso veramente terminali.

Quando lo stadio delle spirali profasiche ha raggiunto un massimo di chiarezza, compare una diminuzione delle spiralizzazioni, le quali, in compenso, diventano di giro più ampio.

Il fenomeno è illustrato dai n. 3, 4 e 5 dello schema dei cromosomi della mitosi (fig. 5). Nel n. 4, in particolare, si nota un fatto importante: esistono dei cromosomi — i più corti — che non presentano spiralizzazioni, e che pertanto mostrano più evidente la spaccatura mediana. Questa spiralizzazione, differente da cromosoma a cromosoma dello stesso assetto, non si limita a questo punto della mitosi, ma diventa più appariscente più avanti. Le figure più interessanti sono quelle n. 5 e 6. Nel 5 si vede un cromosoma con attacco mediano. Nel punto di mezzo vi è una strozzatura primaria, caratterizzata da un tratto



Fig. 3.

Fig. 3. Cromosomi con spirali a giri grandi. In alto crom. atelomitico in basso-meno evidente-cromosoma telomitico. (Ingrandimento circa 1500 volte.)

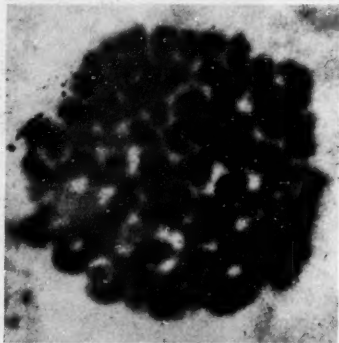


Fig. 4.

Fig. 4. Piastra equatoriale in *Nauplius* tetraploide. (Ingrandimento circa 1500 volte.)

aeromatico dove si presume collocato il centromero, che, come tale, però non si vede. Nelle due braccia vi sono ancora due strozzature (secondarie), una per braccio, e, nei rigonfiamenti interposti, tre giri di spirale: in tutto 12. Il cromosoma in questo stadio consta di due elementi strutturali: uno — ben chiaro nella sua natura — è costituito dalla coppia dei cromonemi spiraliati; l'altro è un «riempimento» dello spazio delimitato dalla spirale, che si colora scarsamente. Circa l'origine e il significato di questo materiale di riempimento — che potremmo chiamare «matrice» come alcuni Autori fanno per tutto ciò che si sovrappone ai cromonemi — non si può dire nulla. È bene tenere presente che un rivestimento, che pure diremo matrice, si è prodotto anche direttamente sul filamento, che appare cresciuto assai in spessore e dal contorno ben marcato. Da questa descrizione si può dedurre che il termine di «matrice» è usato tanto per il rivestimento diretto dei cromatidi, quanto per il materiale che involge la spirale. Usare la stessa parola per due elementi strutturali diversi può essere un inconveniente: però si ricordi che il termine «matrice», usato come equivalente di «rivestimento», non corrisponde ad alcun

concetto preciso, e può perciò designare tutto ciò che riveste la fila di cromomeri. Nella fig. 6 sono riprodotti due cromosomi telomitici. L'attacco al fuso non si vede, ma la mancanza di strozzature fa pensare che non ci sia attacco mediano. Se contiamo le spirali del cromosoma telomitico più lungo, ne troviamo 7; nel più breve 4. Da questa osservazione si ricava un aspetto assai caratteristico della spiralizzazione in *Artemia salina*: i cromosomi più lunghi hanno più spirali, quelli più brevi ne hanno meno. Da questo stadio in avanti, non si osservano più cromosomi brevi senza spirali.

L'aspetto dei cromosomi in questo momento della profase è tale, che, se intervenisse un rivestimento di nuova matrice in modo da nascondere le spirali, si avrebbero dei cromosomi di tipo *Drosophila*, o *Crepis*, a meno dei satelliti rotondi, per ciò che si riferisce a questi ultimi. Invece si osserva che i cromosomi diventano rigidi (o bastoncini spiralati dritti, o a squadra asimmetrica o simmetrica), e si ingrossano senza che le spire ancora si avvicinino come si vede ai n. 7 e 8.

Dallo stadio spirale a questo punto, si verifica, riassumendo, una diminuzione del numero delle spire, che — alla fine — sono poche; non sembra che esse siano più di 7 nei cromosomi più lunghi, 3 nei più corti e conseguentemente di giro più largo; non avvicinano, anzi talvolta appena accennate. Nel passaggio, fra i due tipi di spiralizzazione compaiono le strozzature secondarie, che poi invece scompaiono.

Durante tutta questa parte della profase non si vede quasi mai la spaccatura tra i due cromatidi; l'esistenza di questa è dimostrata dalla sua visibilità in stadi precedenti. Da ciò consegue che non si notano avviticchiamenti tra i cromatidi. Per usare la terminologia di KUWADA, diremo che il cromosoma si comporta come un'ortospirale, in cui due spirali elementari (i cromatidi) siano fortemente connesse l'uno con l'altro.

Dato il diverso numero delle spire nei cromosomi di diverse lunghezze, si raggiunge un maggior accorciamento in quelli più lunghi in confronto dei più corti: così, a profase avanzata, la disparità tra lunghezza dei diversi cromosomi, che avevamo notato essere assai forte durante la spirale profasica, diminuisce fortemente. Ci si può chiedere a questo punto come si comportano quei cromosomi brevissimi (veri microcromosomi) che avevamo notato durante stadi precedenti, riconoscendo che essi non sembravano neppure spiralati. Nessuna traccia della loro presenza risulta a questo punto della profase; può essere che essi si rivestano rapidamente di matrice, e sembrino elementi spiralati, a spirali occultate dal rivestimento esterno. Certo è più probabile questa ipotesi che non quella della loro scomparsa durante la profase; comunque la loro evoluzione non è chiara. Dai n. 8 e 9 della fig. 5 si vede come le spire si accostino, mentre lo spessore delle spire stesse aumenta. I due fenomeni sembrano andare di pari passo, anche se non si può arrivare ad una

misurazione esatta dell'uno e dell'altro. Nel cromosoma del n. 7 (fig. 5), e, parzialmente, nel n. 8 (cromosoma ad attacco mediano) si tratta di spirali aperte, secondo la terminologia di DARLINGTON e URCOTT (1939), mentre nel n.° 9, essendosi i giri maggiormente avvicinati, od essendo addirittura a contatto, si avrebbero spirali vuote o spirali convesse.

L'aumento di diametro del cromosoma, che è evidentissimo, anche perché in questo stadio la colorabilità è forte, può teoricamente essere interpretato in due modi: o come dovuto ad un aumento di matrice o

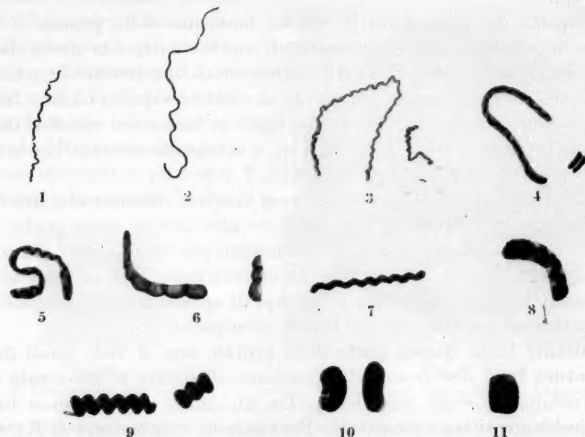


Fig. 5. Stadi della mitosi in cellule del *Nauplius* 1—2 riposo; 3—9 profase; 10 prometafase; 11 metafase. (Ingrandimento circa 1750 volte.)

come determinato dal formarsi di una nuova spirallatura interna. Se si formasse questa ultima — a meno di un allungamento del cromosoma durante la profase non mai osservato — si dovrebbe osservare anche un ulteriore accorciamento del cromosoma. Invece una misurazione compiuta sul cromosoma a 6 spire, anche con molta imperfezione, ci convince che la lunghezza totale del filamento corrisponde a quella riscontrata per gli elementi più lunghi durante il riposo nucleare o nella profase precocissima. In conclusione non sembra probabile ammettere una seconda spirallizzazione (come vorrebbero KUWADA e DARLINGTON), onde l'incremento del diametro sembra doversi riferire all'accumularsi della matrice.

Il senso secondo il quale le spire sono avvolte è talvolta destro e talvolta sinistro, come sembra di dover dedurre dall'esame di alcuni cromosomi telomitici — dei più lunghi — orientati per es. coll'attacco al fuso a destra come appare nel n. 9 della fig. 5. Però non sono in grado

di dire con quale legge vari il fenomeno, perché la spiralizzazione è sempre difficile da osservare nei suoi particolari.

Quando le spire hanno raggiunto il massimo di accostamento, cioè il massimo grado di *packing*, come dicono DARLINGTON e UPCHOTT (1939), un ulteriore rivestimento di matrice eguaglia le rientranze e le sporgenze della spire, il cromosoma assume l'aspetto di ovoidi, o una forma «a rene» che non tradisce più alcuna traccia della spiralizzazione. Durante questo momento ha luogo l'allontanamento dei cromatidi. Esso avviene probabilmente in modo brusco, perché non si notano forme di passaggio: lo stadio del n. 9 è seguito da quello del n. 10 quasi senza ponte di passaggio. I cromosomi hanno ora l'aspetto comune p. es. in diverse specie di Rincoti: gli atelomitici sono quelli reniformi; gli ovoidi sono i telomitici. Mentre la matrice maschera la spiralatura (ciò che avviene con qualche lentezza, a giudicare dai molti stadi di passaggio) e quando i cromosomi non sono ancora così tozzi, è interessante studiare il rapporto tra cromosomi e nucleoli.

Si è già detto che questi sono presenti in numero di due nelle *Artemie* tetraploidi, mentre nelle diploidi se ne riscontra uno solo. Fintantoché i cromosomi sono lunghi e sottili, non riesce di definire i rapporti tra questi e i nucleoli. Invece, a profase inoltrata, si vede che ciascun nucleolo è in stretto rapporto con quattro cromosomi, che sono come affondati per un tratto nella sostanza nucleolare (fig. 6). Siccome si tratta di cromosomi atelomitici, quando la contrazione non è ancora molto avanzata, la loro forma è presso a poco quella di un ferro di cavallo, ed è precisamente vicino alla svolta tra le due braccia che essi si affondano nel nucleolo. Giusta la teoria di HEITZ (1931), deve trattarsi di due coppie di cromosomi SAT. L'osservazione non è priva di interesse, perché fin'ora i cromosomi SAT — piuttosto diffusi nelle Piante — sono stati riscontrati negli animali in pochi casi (v. GEITLER 1938, dove sono dati molti ragguagli bibliografici). Vi è solo da notare che di solito ogni cromosoma SAT dà origine ad un nucleolo, mentre nel caso nostro ben quattro formano un nucleolo solo. Questo nucleolo deve perciò equivalere a quattro fusi assieme. Del resto la tendenza a fondersi si nota anche nei nucleoli delle *Artemie* tetraploidi nel 16% circa dei casi, come già ebbi occasione di notare. L'esistenza di quattro cromosomi che formano il nucleolo dimostra che esiste una costrizione secondaria per ciascuno dei quattro. Essa non si vede, ma ciò non fa meraviglia, date le esigue dimensioni dei cromosomi. I nucleoli rimangono ben visibili fino alla profase avanzata, cioè fino allo stadio descritto; poi scompaiono.

Il punto che abbiamo raggiunto nella nostra descrizione collima coll'inizio della prometafase, segnato dalla scomparsa della membrana



Fig. 6.  
Nucleolo con cromosomi prometafasi.  
(Ingrandimento  
circa 1750 volte.)

nucleare, dei nucleoli (o del nucleolo, a seconda del grado di poliploidia) e alla formazione del fuso. Mentre ciò avviene e i cromosomi si dispongono in piastra, si nota una definitiva contrazione, che impartisce loro una forma sferoidale o quasi cubica. La loro lunghezza media è di  $2\mu$ , che, riferita alla lunghezza massima dei cromosomi despiralizzati all'inizio della profase, dà un coefficiente di spiralizzazione di  $11,0^1$ ; un valore cioè forte, perché vicino a molti dei valori citati da DARLINGTON e UPCOTT (1939) per la meiosi, dove il coefficiente si sa essere particolarmente elevato.

Il fatto più importante, però, è che durante la prometafase, lo scarto della lunghezza media dei cromosomi è minimo (essendo la media di  $2\mu$ , ho trovato valori di  $1,7\mu$  e di  $2,2\mu$ ) mentre durante la profase precoce si notano cromosomi lunghi da  $2,0\mu$  a  $22,0\mu$ . Si verifica dunque il fenomeno (finora non messo in luce per nessun'altra specie) della spiralizzazione e contrazione differenziale, che riduce al massimo la lunghezza di alcuni cromosomi, che sono quelli di maggiore lunghezza.

Questo eguagliarsi delle lunghezze-riassumendo quanto siamo venuti dicendo fin qui-può svolgersi con due procedimenti diversi:

a) il maggior numero di spire nei cromosomi lunghi, in confronto dei cromosomi corti (fino a 6-7 nei primi; 2-3 nei secondi),

b) una maggiore contrazione nei grandi e forse un rigonfiamento nei piccoli. Quest'ultimo fatto non è dimostrato, ma è verisimile.

Le ultime trasformazioni avvengono in fretta; non compaiono caratteri distintivi di forma per classificare le diverse coppie di cromosomi: così avviene che di colpo si passa da uno stadio con cromosomi già molto simili tra loro (la spiralizzazione è già avvenuta), tra i quali però si distinguono ancora elementi più lunghi e più corti, allo stadio finale, caratterizzato da cromosomi pressoché uguali tra loro. La contrazione finale può essere pensata come massimo avvicinamento delle spire (il *packing*<sup>2</sup> secondo DARLINGTON e UPCOTT), alla quale si può aggiungere una contrazione di tutta la massa cromosomica, come potrebbe avvenire in seguito ad una disidratazione. Si sa infatti (KUWADA 1939) che i cromosomi verso la fine della profase si disidratano regolarmente, come fu anche dimostrato sperimentalmente da WADA (1936) e da SHIGENAGA (1937), stando a quello che lo stesso KUWADA riferisce.

L'impostazione esclusivamente descrittiva della nostra ricerca non ci può dire per quale causa i cromosomi più lunghi tendano a spiralarsi e contrarsi di più, e i più brevi a spiralarsi e contrarsi meno. Solo si

<sup>1</sup> Il coefficiente di spiralizzazione è dato dal rapporto fra lunghezza in stato di rilassamento e lunghezza in stato di spiralizzazione contratta di un cromosoma.

<sup>2</sup> Non è facile trovare un'esatta traduzione della parola, mentre è possibile trovarne una per il concetto. Io traduco *packing* con «contrazione» e definisco il fenomeno secondo DARLINGTON; avvicinamento delle spire. L'accorciamento del cromosoma (*contraction* sec. DARLINGTON) è dovuto a: «spiralizzazione + contrazione».

deve concludere che il rapporto tra lunghezza tra due cromosomi metafasi non sempre corrisponde al rapporto tra le lunghezze degli stessi cromosomi in altri momenti della mitosi.

5° *Metafase*: Durante questo stadio i cromosomi, ormai in forma di granuli, non più distinguibili in telomitici e atelomitici, prendono posto nella piastra equatoriale a contatto l'uno coll'altro. Questa fase ha solo interesse per il conteggio. La fissabilità della piastre equatoriali è scarsa: i cromosomi tendono ad agglutinarsi in un disco omogeneo. Nei conteggi della metafase non ho mai osservato numeri diversi da quelli della condizione diploide (42) e tetraploide (84)<sup>1</sup>.

Dalla descrizione che abbiamo fatta, possiamo ora trarre le seguenti conclusioni:

1° il nucleo in riposo delle cellule del *Nauplius* di *Artemia salina* contiene filamenti a spirali allentate e un nucleolo in caso di diploidia, due nucleoli in caso di tetraploidia. Non compaiono cromosomi eteropienotici: forse solo qualche breve porzione di alcuni cromosomi è eterocromatinica, e si accosta al nucleolo.

2° L'anafase e la telofase decorrono rapidamente, senza permettere un esame della struttura cromosomica.

3° La profase è lunga, e mostra fin dall'inizio cromosomi divisi per il lungo. Alcuni di essi sono lunghi, altri assai brevi. Vi sono due spiralizzazioni successive: la prima (stadio delle spirali profasiche) è a giri numerosi e minuti; la seconda (che deriva dalla prima con uno stadio di passaggio caratterizzato da strozzature) è a spire grandi e in piccolo numero. Alcuni cromosomi sono telomitici, altri atelomitici. Due coppie nelle Artemie diploidi e quattro nelle Artemie octoploidi sono costituite da cromosomi SAT.

4° Nella prometafase e nella metafase i cromosomi si contraggono fortemente e la loro struttura a spirale viene occultata dalla matrice: essi allora sono tutti presso a poco lunghi uguali, e di aspetto granulare.

5° Non si è dimostrata nè l'esistenza di mezzi cromatidi, nè quella di una spirale composta con spirale grande e piccola.

<sup>1</sup> Talvolta mi è occorso di notare alcune piastre equatoriali piccole con cromosomi molto confusi, che non permisero il conteggio. Non posso perciò garantire che si tratti di cellule a numero dimezzato di cromosomi.

Nello stesso modo non posso escludere che in qualche metafase ci sia qualche cromosoma in più o in meno (cellule eteroploidi): deve però certo trattarsi di variazioni numeriche che interessano pochissime unità.

Riguardo alla forma dei cromosomi metafasici, ricordo che essa è quella indicata da ARTOM (1922), che esaminò quasi soltanto prometafasi e metafasi. La differenza di forma tra cromosomi delle Artemie diploidi anfigoniche e quelle tetraploidi partenogenetiche che Artom descrisse, non è confermata dalla presente ricerca: Artom credette di ravvisarla comparando fasi mitotiche non del tutto identiche tra loro, ciò che non fa meraviglia data la tecnica usata allora (affettatura e colorazione con Ematossilina ferrica) certo meno precisa di quella di cui oggi possiamo disporre.

La descrizione della mitosi che abbiamo testè completata, permette una serie di raffronti con quanto altri ricercatori hanno osservato in specie molto lontane da *Artemia*.

Un primo punto si riferisce alle spirali profasiche. Abbiamo già accennato al fatto che BĚLAŘ (1929), SHARP (1929), STRAUB (1939) e KUWADA (1939) riconoscono in diverse specie di Pianta lo stadio in questione, riproducendo anche delle figure molto affini a quelle riscontrate in *Artemia*. È necessario però tenere presente che DARLINGTON (1935) non riconosce le spirali profasiche in *Fritillaria*, e pensa che la spiralizzazione cominci, durante la profase precoce, come un avvolgimento ad elica delle molecole del cromonema (la spirale molecolare, invisibile perciò anche coi più potenti mezzi di ingrandimento), la cui presenza si potrebbe dimostrare solo indirettamente (DARLINGTON e UPCOTT, 1939). Bisogna convenire che la tesi di DARLINGTON non è condivisa da molti; tuttavia non si possono mettere in dubbio le osservazioni di questo espertissimo citologo. Si può dunque supporre o che lo schema sostenuto da BĚLAŘ, SHARP, STRAUB, KUWADA e infine dalle mie osservazioni non abbia valore generale, oppure che in *Fritillaria* la spiralizzazione sorga come un fenomeno di ordine supermolecolare, ma sia mascherato da un precoce rivestimento di matrice. Infatti la tesi di DARLINGTON della spirale molecolare è una interpretazione addotta per spiegare un primitivo accorciamento accompagnato da ispessimento del cromosoma, senza che si vedano spirali.

Ammettendo che la tesi di DARLINGTON valga senz'altro per *Fritillaria*, la discrepanza tra le due tendenze nello spiegare la profase precoce consiste nel ritenere che la spiralizzazione sorga come fenomeno molecolare e perciò invisibile, oppure come fenomeno supermolecolare, cioè che interessi aggregati di molecole già al suo nascere.

Le mitosi descritte in *Artemia* rappresentano un nuovo appoggio a quest'ultima tesi, ma non permettono di negare il valore della prima, almeno per il genere *Fritillaria*.

Un secondo punto merita una precisazione: il passaggio tra la prima e la seconda spiralizzazione, cioè successivo alle spirali profasiche, che si potrebbero forse chiamare opportunamente spirali di I ordine, in contrapposto a quelle a giro più ampio, che si potrebbero considerare di II ordine: infatti sono ambedue profasiche.

BĚLAŘ (1929) parla di despiralizzazione dopo le «*Chromosomenspiralen*», e non allude poi ad una ulteriore spiralizzazione. DARLINGTON, in una espressione primitiva del suo pensiero (1935 e 1937), rappresenta la profase come in progressivo aumento di spessore dei cromosomi, che sono contorti in spirali grossolane, mentre — come si disse — la spiralizzazione primitiva è invisibile perché di ordine molecolare. In seguito alla spiralizzazione molecolare i cromatidi diventerebbero sempre più grossi e tozzi, e successivamente si avvolgerebbero, avviticchiandosi l'uno sull'altro. Più

recentemente, in collaborazione con UPCOTT (1939), lo stesso Autore elabora un secondo schema, probabilmente perché accoglie anche i risultati da chi ha lavorato su materiale diverso da *Fritillaria* (soprattutto *Tradescantia* e *Gasteria*), e vede il processo nel modo seguente: 1° spirale molecolare, 2° spirale grande, formata da un filamento a sua volta spiralato; il passaggio dalla spirale molecolare alla nuova spirale è continuo.

KUWADA vede il fenomeno in modo più complesso. Anzitutto ritiene dimostrata l'esistenza di quattro cromatidi e di due mezzi cromatidi per ogni cromatidio, accogliendo le vedute di NEBEL e RUTTLE (1937), e inoltre ritiene che ciascuna delle coppie di cromatidi fratelli (che è spiralata allo «*spiral stages*») rallenti la spiralatura, mentre i cromatidi si avviciano l'uno sull'altro; è nei mezzi cromatidi che sorgerebbero le nuovi spirali.

Non conosco contributi più recenti alla conoscenza del passaggio tra la prima e la seconda spiralizzazione.

I fenomeni osservati in *Artemia* sono poco in accordo colla teoria di DARLINGTON e di KUWADA, perché non si osserva spirale composta di spirale minore o maggiore, e non si vedono i quattro cromatidi o gli otto mezzi cromatidi nel cromosoma profasico.

Perciò, anche se si ammette che in *Artemia* le spirali di KUWADA ci siano, anche se invisibili, resta sempre indiscutibile caratteristica di questa specie l'allentamento delle spirali profasiche e la riduzione del loro numero fino a non più di 6—7 nei cromosomi più lunghi, mentre il passaggio fra i due stadi è segnato dalla comparsa delle strozzature.

Lo schema di STRAUB è più vicino al nostro perché è più semplice e non tiene conto dei mezzi cromatidi e della duplicità dei cromatidi.

Infine è bene sottolineare il fenomeno più caratteristico della *Artemia*: l'uguagliarsi progressivo delle lunghezze dei diversi cromosomi man mano che ci si avvicina alla metafase, mentre gli stadi precoci della profase dimostrano una grande varietà tra le lunghezze effettive dei cromonemi.

#### *B. Nuclei poliploidi.*

Negli elementi muscolari collocati negli arti del *Nauplius* già al momento della schiusura dell'uovo vi sono dei grossi nuclei, che contengono numerosissimi cromosomi. Il loro aspetto generale è di vescicole ovalari ripiene di filamenti. Un conteggio di questi è impossibile; dato il loro numero elevato, i nucleoli sono più o meno nascosti: siccome però se ne vedono qualche volta otto, si deve inferire che (dato che 84 cromosomi corrispondono a due nucleoli) i cromosomi siano 336, e il grado di poliploidismo 16. Non si può escludere che alcune cellule abbiano anche un grado più elevato.

La forma dei cromosomi in queste cellule varia, perché non mancano (sebbene rari) fenomeni di endomitosi. Siccome queste si incontrano più facilmente nelle cellule del *Metanauplius*, le descriveremo più avanti.

Per ora diremo che le endomitosi per il passaggio dal numero base (42 o 84) al numero doppio, negli elementi muscolari già presenti nelle appendici del *Nauplius* devono aver luogo durante lo sviluppo entro l'uovo.

In generale i cromosomi più lunghi raggiungono i 6—7  $\mu$ . Nello stadio più comune — che deve essere considerato di riposo — non sono spiralati: sono soltanto ad andamento variamente sinuoso e di spessore maggiore di quello dei cromosomi in riposo delle cellule comuni; le loro estremità sono arrotondate. Ritengo che si tratti di elementi provvisti di un debole rivestimento di matrice anche in questa fase; essi sono assai più brevi di quelli del riposo nucleare delle cellule comuni.

## II. La struttura del nucleo in riposo e la mitosi delle cellule diploidi e tetraploidi del *Metanauplius* nei suoi diversi stadi.

Negli stadi successivi a quello di *Nauplius* si riscontrano alcuni fatti degni di nota per ciò che si riferisce alla struttura dei cromosomi.

Le mitosi si osservano man mano più scarse, e sembra che si svolgano secondo uno schema semplificato, specialmente per quello che riguarda la profase, mentre gradatamente il numero delle endomitosi aumenta. Non credo che si possa senz'altro affermare che le mitosi siano molto minori già nei primi giorni di vita del *Metanauplius*, in confronto col *Nauplius*. Si può pensare anche che una maggiore rapidità di decorso delle varie fasi (e probabilmente soprattutto di alcune) ne renda difficile l'osservazione. Certo, le endomitosi — che già si osservano verso la fine dello stadio di *Nauplius* — diventano poi sempre più frequenti: e il risultato è che, più si procede nello sviluppo, più numerose diventano le cellule somatiche poliploidi. È ovvio che, a sviluppo molto avanzato, le mitosi siano rarissime.

Diciamo in breve anzitutto qualcuno dei fatti che caratterizzano meglio lo sviluppo. Per maggiori particolari, rimando al mio lavoro del 1939.

a) Il *Nauplius* non ha ancora l'intestino pervio; questo comincia a divenire tale e a funzionare solo alla fine di questo stadio. Le prime cellule poliploidi (oltre a quelle muscolari che già si vedono alla schiusa) si producono nella regione dorsale anteriore (area delimitata approssimativamente dalla linea punteggiata nella fig. 7).

b) Il *Metanauplius I* presenta alcuni abbozzi di segmentazione toracica. Si formano degli aggregati di cellule a distanza uguale tra loro; a destra e a sinistra del tubo intestinale, che, secondo ARTOM (1926), sono gli abbozzi dei gangli. Durante questo stadio aumentano le endomitosi, che si riscontrano prevalentemente negli elementi muscolari: questi sono disposti negli arti natatori (le future seconde antenne) e nella parete del faringe.

c) Il *Metanauplius II* ha già l'abbozzo dei primi arti toracici, e degli arti laterali. Le endomitosi si riscontrano sempre nel tessuto muscolare che riveste l'intestino e che via via si va rinforzando, e nei gangli.

d) Il *Metanauplius III* ha oramai gli occhi laterali pigmentati e un numero maggiore di abbozzi di arti (7-8). Le endomitosi continuano nei tessuti e negli organi indicati.

e) Il *Metanauplius IV* comincia a muovere ritmicamente i primi arti toracici, e le appendici natatorie del *Nauplius*, che non aumentano di

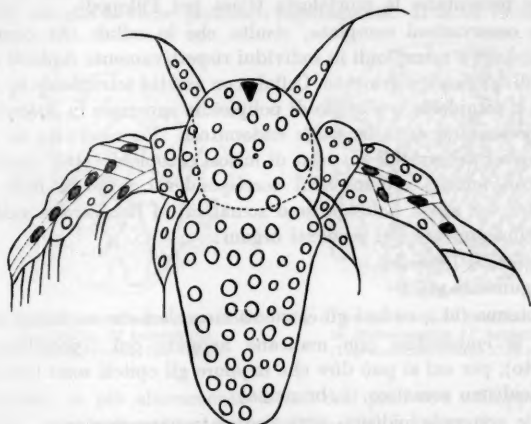


Fig. 7. Schema di *Nauplius*. Le aree tratteggiate indicano i nuclei degli elementi muscolari; le altre, il nuclei delle altre cellule; la linea punteggiata circonda la zona nella quale si svolgono le prime endomitosi. (Ingrandimento circa 125 volte.)

dimensione, cominciano a prendere l'aspetto di antenne. Si inizia la formazione della muscolatura degli arti, dove pure si osservano endomitosi. Nelle cellule del tegumento se ne produce pure qualcuna, ma non è facile individuarne la posizione, dato lo schiacciamento degli organi, che viene prodotto durante l'allestimento del preparato.

f) L'*Artemia* giovane ha ormai l'aspetto dell'adulto: le undici paia di arti toracici sono ormai tutte funzionanti, ricche di muscolatura e fornite di un epipodite ovale piatto: la branchia. Endomitosi si osservano quasi dappertutto nel muscoli nelle branchie e nei gangli, mentre le mitosi continuano quasi solo nell'epitelio intestinale e nelle cellule del tegumento.

g) Nell'adulto compaiono i caratteri sessuali. Il solo carattere sessuale secondario delle antenne del maschio (antenne del II paio cresciute in forma di corna piatte, atte a trattenere la femmina durante la copulazione) si produce rapidamente con mitosi<sup>1</sup>: le cellule che lo costituiscono sono

<sup>1</sup> Queste non hanno potuto essere studiate, per la scarsità di materiale adatto di cui potei disporre.

praticamente tutte diploidi (i maschi conosciuti sono solo diploidi). Il carattere sessuale primario più appariscente della femmina è il sacco nel quale si raccolgono le uova (utero). È formato di una parete muscolosa, che contiene un grappolo di 20—30 cellule grandissime (cellule «nutricie») con elevatissimo numero di cromosomi. Gli ovari e i testicoli sono posti nella cavità del corpo all'inizio dell'addome. Sul loro contenuto non mi diffondo, perché l'esame della struttura nucleare delle cellule germinali farà parte di una altra ricerca. Gli organi sessuali maschili sono assai piccoli, e presentano la morfologia tipica pei Fillopodi.

Dalle osservazioni compiute, risulta che le cellule che contengono assetti diploidi e tetraploidi in individui rispettivamente diploidi o tetraploidi si dividono regolarmente. Cellule con assetto tetraploide in *Artemia* diploide, o octoploide o a grado di poliploidia superiore in *Artemia* tetraploide, presentano *esclusivamente* endomitosi. Fu osservato in un solo *Metanauplius* tetraploide un caso di mitosi octoploide (168 cromosomi). Cellule con numeri cromosomici corrispondenti a quelli delle cellule germinali (cioè senza poliploidismo somatico) si riscontrano nell'adulto quasi esclusivamente nei seguenti organi:

1° intestino (epitelio),

2° tegumento (id.),

3° antenna (id.), esclusi gli elementi muscolari che ne fanno parte.

Però le endomitosi non mancano neppure qui (specialmente nel tegumento), per cui si può dire che neppure gli epiteli sono tessuti privi di poliploidismo somatico (v. branchia).

Cellule con poliploidismo somatico si trovano invece:

1° nel tessuto muscolare,

2° nel tessuto nervoso,

3° nelle cellule di rivestimento delle branchia (epiteliali), che sono però solo a numero cromosomico raddoppiato, e forse neppure sempre.

4° nelle cellule, dette nutrici, dell'utero.

Gli elementi connettivi e circolanti hanno una struttura nucleare particolarissima che non permette conteggi cromosomici, nè diretti nè indiretti.

Premessa questa norma dei fenomeni cromosomici durante lo sviluppo di *Artemia*, passiamo alla descrizione dei fenomeni stessi.

1° *Nucleo in riposo delle cellule a numero cromosomico base*: Abbiamo detto che il nucleo in riposo delle cellule non poliploidi del *Nauplius* contiene i cromosomi dall'aspetto filamentoso, sottilissimi, con una dubbia struttura a cromomeri, «con notevoli spiralizzazioni rilasciate non del tutto irregolari», e uno o due nucleoli (a seconda del numero cromosomico). Se osserviamo i nuclei in riposo dei *Metanauplius I* e *II*, prelevati in giorni successivi dalle culture, in modo da seguire passo passo lo sviluppo, notiamo che più o meno l'aspetto loro non cambia.

Anche il *Metanauplius II* per alcuni giorni mantiene la stessa struttura nucleare, compresa la presenza del o dei nucleoli; è solo 4 o 5 giorni dopo che gli occhi sono pigmentati, cioè verso la fine dello stadio (quando lo sviluppo decorra un pò lentamente a temperatura non molto elevata, cioè intorno ai 15°, con raffreddamento notturno, lo stadio di *Metanauplius III* dura anche una settimana), che i cromosomi diventano in tutti i nuclei singolarmente pallidi con spiralture minime e irregolari (fig. 8). Questo aspetto si riscontra fintantoché non compaiono i caratteri del *Metanauplius IV*, ciò che avviene piuttosto rapidamente. Il fatto fu constatato



Fig. 8. Nucleo in riposo di cellula tetraploide in *Metanauplius II* tetraploide. (Ingrandimento circa 1750 volte.)



Fig. 9. Nucleo in riposo di cellula tetraploide in *Metanauplius IV* tetraploide. (Ingrandimento circa 1750 volte.)

naturalmente in più allevamenti, alcuni dei quali con sviluppo un po' accelerato, con temperature elevate (18°—20°) e costanti.

Nel *Metanauplius IV* i caratteri fondamentali dei cromosomi in riposo sono due:

- a) una forte deposizione di matrice, per cui i filamenti diventano fortemente colorabili, con ingrossamenti, e a decorso sinuoso irregolare, senza vere spiralture (fig. 9),
- b) nei nuclei delle cellule dell'epitelio intestinale, una minore cromaticità, con maggiore sottigliezza dei cromosomi.

Un problema di non facile soluzione è presentato dalla comparsa degli ingrossamenti lungo l'asse dei cromosomi. Si può pensare che essi siano cromomeri multipli, già descritti da GETTLER (1937, 1939) in *Gerris* col nome di *Sammelchromomeren*. Oppure si può ritenere che si tratti di spiralizzazioni o nodi del cromonema rivestiti di matrice, oppure di solo accumulo di matrice su un cromonema non spiralizzato. Non si può dire quale ipotesi abbia maggiore verosimiglianza; si può però notare che l'ipotesi dei cromomeri multipli può essere sostenuta ammettendo solo la riduzione della lunghezza dei tratti intermedi tra i cromomeri primitivi, ciò che può essere inteso solo come perdita di qualche componente delle sostanze intercromomeriche, ad esempio acqua.

Riassumiamo ora i fatti osservati, e vediamo come si ricolleghino con le conoscenze già acquisite a questo proposito.

Durante lo sviluppo v'è una riduzione di cromaticità fin verso lo stadio di *Metanauplius III*. Dal *Metanauplius IV* in avanti si nota un rivestimento di matrice, che si manifesta assai meno nelle cellule dell'epitelio intestinale. L'indicazione di rivestimento di matrice è evidentemente una pura espressione formale: con essa si vuole alludere — conformemente alla terminologia usata — al formarsi di un rivestimento cromatico sulla superficie del filamento a cromomeri, che rimane mascherato del tutto, mentre aumenta lo spessore del cromosoma.

I cromosomi sono più regolarmente spiralati nei primi stadi, ad andamento più semplice, anche se irregolare negli ultimi (a partire da *Metanauplius IV*).

Prima dello stadio adulto, non si può mai parlare di struttura nucleare a reticolo e ad alveoli; del pari, non si osservano nè nuclei acromatici nè a struttura granulare.

Si deve dunque ritenere che nelle cellule nelle quali hanno luogo fenomeni di riproduzione si riscontrino sempre la presenza dei cromosomi.

Le osservazioni testè riassunte non trovano riscontro con quelle di altri ricercatori, perché di solito vengono prescelti determinati tessuti, particolarmente facili per lo studio. Come si è avvertito in principio, i casi meglio conosciuti nel campo zoologico sono quelli dei *Rincoti* e dei *Ditteri*. Nel primo esempio i cromosomi in riposo sembrano cambiare poco dallo stato in cui si trovano durante le mitosi: però GEITLER ha descritto soprattutto la struttura dei nuclei poliploidi, di cui noi non abbiamo ancora parlato. Invece le ricerche di BERGER (1938) hanno dimostrato che il tipo di nucleo salivare, con cromosomi quasi o totalmente despiralizzati, è largamente diffuso nelle larve e negli adulti di diversi generi di *Ditteri*.

In generale gli Autori si contentano di riconoscere che il nucleo in riposo ha struttura filamentosa anche quando ciò non risulta, perché la sua scarsa fissabilità non permette di mettere in evidenza la struttura (WHITE, 1937). Invece la struttura reticolare oggi non è ammessa quasi da alcun citologo, se si toglie SHARP (1929) per *Vicia*; ciò peraltro viene discusso da KUWADA (1939).

Dobbiamo riconoscere che *Artemia salina* si presta in modo singolare a darci un esempio di struttura a cromosomi con spirali rilasciate durante il riposo, corrispondendo in tutto a quello che la Genetica presuppone, e cioè che i cromosomi siano strutture stabili che non si scompongono durante il riposo nucleare. I nuclei a reticolo (non rappresentando se non un caso limitato a elementi che non si dividono, nè verisimilmente si accrescono) verranno descritte più avanti.

Si può dunque accostare *Artemia salina* ai Ditteri, i quali tuttavia posseggono non già cromosomi semplici, ma giganti, perché determinati dalla sinapsi somatica dei cromonemi omologhi, caratteristica di questo Ordine. Il comportamento di *Gerris* è invece notevolmente diverso, perché non vi è manifesta né la spiralizzazione durante il riposo, né la spiralizzazione durante la mitosi.

I fatti nuovi messi in evidenza sono soprattutto:

1° quello di un periodo di sviluppo con cromosomi dotati di cromaticità scarsissima.

2° di un periodo (dal *Metanauplius IV* in avanti) caratterizzato da cromosomi con rivestimento di matrice durante il riposo con scomparsa quasi totale delle spirali. È degno di essere rilevato che queste trasformazioni sono completamente al di fuori di fenomeni mitotici o endomitotici: e appunto per questo sono insieme nuove ed ardue da interpretare.

2° *La mitosi nelle cellule del Metanauplius del giovane e dell'adulto:* La mitosi nelle cellule del *Metanauplius*, dell'*Artemia* giovane e adulta, sono scarse, rispetto a quelle che si contano nel *Nauplius*. Può darsi però che la diminuzione sia soprattutto apparente, e dovuta alla maggiore rapidità con cui decorrono. Se ne vedono tanto nell'epitelio intestinale quanto negli arti.

L'anafase e la telofase sono rapide, e hanno lo stesso aspetto di quello dei *Nauplius*, mentre la profase si scosta da quella già descritta. Infatti, tranne che nei casi sporadici di *Metanauplius* giovani (dove il processo segue più da vicino il tipo del *Nauplius*), non si vede alcuna traccia di spirali profasiche, al punto che si sarebbe tentati di negare l'esistenza di queste. La profase precoce è riconoscibile per una maggiore visibilità (cioè colorabilità e nettezza) dei filamenti cromosomici in confronto dello stadio di riposo. Poi, senza che si vedano stadi spiralizzati, si passa allo stadio di cromosomi contratti (talvolta con tracce di spirali grandi, molto mascherate dalla matrice) in tutto simili a quelle della prometafase del *Nauplius*. Il fatto che si arrivi a una metafase uguale a quella del *Nauplius*, senza vedervi gli stadi precedenti, può essere inteso in due modi: o nel senso che la rapidità (però non dimostrata) della profase non permetta l'osservazione delle forme di passaggio, oppure nel senso che effettivamente queste manchino.

Naturalmente ci si pone il problema: è possibile che uno stadio di una fase mitotica manchi in momenti diversi dello sviluppo, anche vicini tra loro? Se scorriamo la bibliografia, non troviamo neppure una precisa formulazione del problema; e perciò neppure una risposta. Nel trattato di GEITLER (1938) troviamo solo qualche notizia frammentaria, poiché l'A. afferma (pag. 7) che, durante l'ontogenesi, si osservano solo variazioni di poca entità nella «grandezza dei cromosomi», affermazione che è tuttavia in parte contraddetta da una figura, dove sono riprodotti i cromosomi metafasici di *Cyclops* (materiale affine ad *Artemia*), dove i

cromosomi della II mitosi di segmentazione sono evidentemente più grandi di quelle in ugual stadio (metafase) di una cellula nervosa di *Nauplius*; analoga impressione si riceve osservando le figure di *Icerya purchasi*. Però in generale GRITLER confronta i cromosomi nello stesso stadio in tessuti diversi, ciò che non è la stessa cosa di quanto andiamo facendo noi, perché appunto *non* troviamo lo stesso stadio. Dobbiamo dunque concludere che il problema non è stato visto — per quanto mi consta — nella sua importanza, e forse essa non è poca. Infatti, se si afferma che le spirali profasiche nelle cellule del *Metanauplius* non esistono, si deve concludere che esse non hanno un'importanza assoluta nelle trasformazioni del cromosoma necessarie per la mitosi. E ciò vale a dire che (se il cromosoma può assumere un identico aspetto metafasico attraverso diverse serie di trasformazioni) tutte si equivalgono tra loro, e che l'una piuttosto che l'altra è determinata dalle condizioni generali della cellula e dell'organismo, nel momento ontogenetico e nell'organo nel quale la mitosi avviene.

Se poi dovessimo infine decidere se è più verisimile ammettere o negare l'esistenza delle spirali profasiche in queste mitosi, dovremmo convenire che il non osservarle mai dopo lo stadio di *Nauplius*, fa pensare che esse non ci siano, perché, anche con mitosi molto rapide, qualche volta si dovrebbe pure coglierle, quando si esaminano molto materiale, come si è fatto in questa ricerca.

Concludo dunque che, probabilmente, sono solo le condizioni nelle quali si trovano le cellule del *Nauplius* che realizzano le spirali profasiche.

### III. L'endomitosi negli elementi muscolari.

Il carattere fondamentale dell'endomitosi è quello di consistere in una divisione dei cromosomi, senza divisione del nucleo. Pertanto vi si può facilmente riconoscere una profase e una telofase, mentre la metafase e l'anafase sono meno tipiche, mancando la piastra equatoriale e l'allontanamento dei cromatidi verso i poli.

In *Artemia* il fenomeno presenta ancora una particolarità: l'endomitosi (che differisce inoltre dalla mitosi tipica del *Nauplius* per ciò che concerne la spiralizzazione) non sembra risentire del numero dei cromosomi. Vale a dire, si distingue una endomitosi che serve di passaggio dal poliploidismo al tetraploidismo o all'octoploidismo, rispettivamente; e una endomitosi che conduce dal tetraploidismo od octoploidismo all'octo- o sedeciploidismo; non escludo infine che esistano forme di endomitosi anche per gradi di poliploidia più elevati. Appunto perché i due tipi di endomitosi hanno determinati caratteri, indipendentemente dal numero cromosomico base, credo opportuno denominarli: endomitosi di I grado e di II grado.

*Endomitosi di I grado:* È frequente negli elementi muscolari di stadi di sviluppo poco precoci, in *Artemie* giovani. La profase si inizia con filamenti doppi a cromomeri molto ben distinti; più che nelle mitosi del

*Nauplius* (v. n. 2 della fig. 10). Non si osservano spirali profasiche: si direbbe che dallo stadio a cromomeri si passi ad un altro (v. n. 3 fig. 10) a filamenti con qualche ingrossamento e qualche strozzatura poco evidenti, nel quale vi è già un notevole rivestimento di matrice: resta pertanto il dubbio che le spirali profasiche ci siano, ma siano mascherate; questo appare piuttosto probabile, se si tiene conto di un lieve accorciamento del cromosoma, in confronto dello stadio precedente. Dopo questo punto si passa ad una fase di massimo accorciamento di spessore, che è raffigurata al n. 4 della fig. 10. Siccome non ho riscontrato con certezza uno

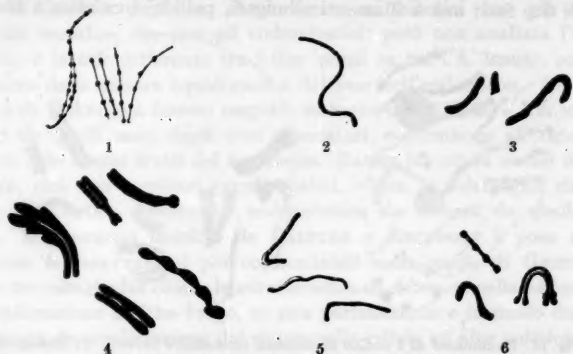


Fig. 10. Fasi di endomitosi in elementi nervosi e muscolari. 1—4 Endomitosi di I ordine. 1 riposo-endoprofase precoce; 2—3 endoprofase; 4 endometafase; 5 endoprofase; 6 endometafase di endomitosi di II ordine. (Ingrandimento circa 1750 volte.)

stadio ulteriormente contratto, considero questo come corrispondente alla metafase.

Le caratteristiche sono: una evidentissima spaccatura mediana, la scomparsa quasi completa di sinuosità, ciò che sembra indicare una certa rigidezza, e, infine, la presenza, piuttosto variabile, di un certo numero di ingrossamenti alternati con rientranze (ben visibili nel cromosoma che si trova più a sinistra e in quello che sta più a destra della figura), che io tenderei a interpretare come tracce di spiralizzazioni corrispondenti alle grandi spirali della mitosi del *Nauplius*. Siccome esse sono simmetriche rispetto alla spaccatura mediana, dato che si tratti proprio di vere tracce di spiralizzazione, si dovrebbe inferire che ogni cromatidio si sia spiralizzato per conto proprio, uno in un senso destrorso e uno in sinistrorso.

In alcuni elementi (quelli in alto a destra della figura) si vedono strozzature vere e proprie, che sembrano secondarie: infatti questi cromosomi sembrano essere di tipo SAT; e ricordiamo di avere già riconosciuta la presenza di almeno due coppie di questi cromosomi.

L'anafase e la telofase decorrono in modo rapido (come sempre in *Artemia*) e non sono facilmente riconoscibili. La mancanza di fusi ci

garantisce che le figure descritte sono effettivamente stadi di endomitosi. I nucleoli dopo la endomitosi sono raddoppiati: sono cioè due nelle Artemie diploidi e quattro nelle tetraploidi, con una certa tendenza alla fusione, per cui si vedono anche cellule octoploidi con tre nucleoli.

**Endomitosi di II grado.** Sono tipiche degli elementi muscolari, che sono quelli dove il poliploidismo somatico è maggiore: delle cellule «nutricie» dell'utero, che sono pure a numero cromosomico molto elevato ma per più rispetti, aberranti, sarà detto più avanti.

Nei numerosissimi nuclei osservati, non mi è mai occorso di vedere più di due fasi: una a filamenti allungati, pallidi, e un'altra a filamenti



Fig. 11. Endomitosi di I ordine in elementi muscolari e nervosi. 1: Endoprofase; 2 endometafase. (Ingrandimento circa 1750 volte.)

più corti e grossi, più colorabili; la prima è presumibilmente la fase di riposo, la seconda quella di divisione.

La prima non dimostra nessuna struttura a cromomeri (probabilmente perché vi è sempre un certo rivestimento uniforme di matrice) e neppure una spaccatura mediana. La seconda fase presenta la spaccatura, e alcuni ingrossamenti che possono essere interpretati o come *Sammel-chromomeren*, o come tentativi di spiralizzazione. Io tenderei verso quest'ultima ipotesi, dato l'accorciamento in lunghezza di questo stadio in confronto al precedente. Le dimensioni dei cromosomi in questi nuclei ad alti numeri cromosomici sono piccole: gli elementi più lunghi non superano i  $6\mu$ , mentre — a parità di stadio — nell'endomitosi di I ordine, i più lunghi sono di  $9-10\mu$ .

L'impressione che si ricava da queste osservazioni conduce a concludere quanto segue:

1° la spiralizzazione profasica o di I ordine non si vede (manca?);

2° la spiralizzazione a grandi giri, caratteristica preparazione alla metafase della mitosi del *Nauplius*, ha luogo in modo dubbio e incostante. Perciò i cromosomi, alla fine della profase, sono in uno stadio che corrisponde a quello n. 4 o n. 5 della fig. 5.

3° la endomitosi di II ordine si manifesta come un fenomeno abbreviato rispetto a quella di I ordine, e non dimostra alcuna despiralizzazione e perdita completa di matrice durante il riposo nucleare susseguente.

Questi tre punti classificano bene il fenomeno di *Artemia*. Per ciò che si riferisce alla endomitosi in generale, conosco tre sole descizioni: quella di GEITLER, già ricordata per i RINCOTI (1939), quella di D'ANCONA (1939) per le cellule epatiche di alcune specie di Mammiferi e, infine, quelle di BAUER (1938) sulle cellule di rivestimento dell'ovario di *Lucilia caesar* e di PAINTER e REINDORF (1939) per *Drosophila melanogaster*. Le figure di GEITLER direbbero che i cromosomi mitotici sono più accorciati alla metafase che non gli endomitotici: però non analizza l'osservazione, e le sole differenze tra i due punti su cui l'A. insiste, sono la mancanza della piastra equatoriale e del fuso nell'endomitosi. Le osservazioni di D'ANCONA furono eseguite su materiale difficile e con metodi diversi da quelli usati dagli altri ricercatori, e permisero all'Autore di scorgere solo alcuni tratti del fenomeno. BAUER lavorò su nuclei di tipo salivare, cioè con caratteri peculiarissimi, e non fa meraviglia che qui la fase di massima contrazione endomitotica sia diversa da quella mitotica. Il fenomeno descritto da PAINTER e REINDORF è poco netto. Insomma le osservazioni più confrontabili sono quelle di GEITLER e le mie: tra esse risulta chiara la caratteristica di *Artemia*: nella endomitosi la spiralizzazione non ha luogo, se non parzialmente e in modo dubbio; la mancata despiralizzazione del riposo nelle cellule ad alto poliploidismo somatico trova invece riscontro in *Gerris*, dove i cromosomi cambiano assai poco d'aspetto a mitosi od endomitosi finita<sup>1</sup>.

Ci si può ora porre il problema seguente: se le variazioni della forma dei cromosomi è dovuta al loro numero accresciuto o alla mancanza dei fatti dinamici della mitosi (trasporto lungo il fuso). Siccome le variazioni descritte hanno luogo per le Artemie diploidi quanto per le poliploidi, dovremo concludere che è il secondo fatto che sembra essere importante. Si dovrebbe dunque pensare che è la tendenza delle cellule a dividersi che determina la spiralizzazione a grandi giri e la contrazione finale, mentre la deposizione di matrice (e forse anche la spiralizzazione profasica) avviene indipendentemente dalla divisione.

Noteremo infine che i nuclei poliploidi sono più grandi (e non poco) dei diploidi; il metodo dello schiacciamento non permette però di fare delle misure.

#### IV. Endomitosi delle cellule nervose.

I gangli in stadi di sviluppo precoce contengono cellule che non hanno aspetto particolare, ma sono sede di frequenti endomitosi. Queste decorrono in modo uguale a quelle dette di I grado, descritte per gli elementi

<sup>1</sup> Durante la correzione delle bozze vengo a conoscenza del lavoro sintetico di GEITLER (Erg. d. Biol. 1941, 18, 1), dove sostanzialmente la questione rimane invariata rispetto alle notizie precedenti.

muscolari. Non vi ho osservato endomitosi di II grado. Le osservazioni si compiono più facilmente per i gangli ottici degli occhi laterali, perché sono più voluminosi.

#### V. Endomitosi nelle cellule delle branchie.

La branchia (epipodite) è un organo piatto di contorno ovale (v. fig. 12). Essa è costituita da una doppia lamina unicellulare saldata agli

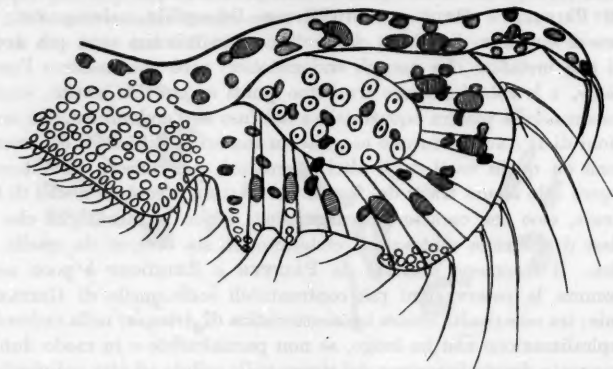


Fig. 12. Schema di arto. (Ingrandimento circa 50 volte.)

○ cellule branchia

● el. muscolari

● c. tegumento

○ el. con nuclei a strutt. alveolare.

orli; tra esse rimane una intercapedine sottile entro la quale passa il liquido circolante. Le cellule che formano le lamine sono grandi con nuclei sferici. Fino allo stadio di *Artemia* giovane si osserva qualche mitosi: durante l'accrescimento ulteriore e lo stadio adulto, invece, vi è qualche endomitosi. I nucleoli si vedono male, perciò non è facile determinare il grado di poliploidismo che — mediante dette endomitosi — viene raggiunto: ritengo però che non vi siano se non cellule tetraploidi o octoploidi.

La struttura del nucleo è singolare. I cromosomi appaiono come lunghi filamenti con andamento sinuoso (senza che si possa parlare con certezza di vere spirature) però con sinuosità numerose e larghe (n. 1 fig. 13). La differenza tra questo aspetto e quello dei nuclei del *Nauplius* e *Meta-nauplius* precoce è paragonabile a quella che intercorre tra l'aspetto di un capello ondulato e quello di un capello ricciuto. Un altro carattere

peculiare di questi cromosomi è quello di non presentare una netta struttura a cromomeri, e di essere fortemente colorabili; penso perciò che sia sempre presente una certa quantità di matrice.

Gli stadi che ho potuto distinguere sono i seguenti: uno (n. 2 della fig. 13) con cromosomi che hanno perso le grandi sinuosità, e che appaiono invece finemente piegheggiati o spiralati, con maggiore colorabilità; interpreto questo stadio come una spirale profasica, a contorni meno netti e a spessore maggiore dello stadio corrispondente della mitosi del *Nauplius*. Si ha poi uno stadio di massima contrazione (endometafase, n. 3 fig. 13) che mostra i cromatidi ben staccati e in via di dissociazione, con poche spirali appena accennate e non avvicinate. L'aumento di spessore in questo stadio è minimo: segno probabile che la matrice aumenta



Fig. 13. Endomitosi nelle cellule della branchia (epipodite). 1 riposo; 2 endoprofase; 3 endometafase. (Ingrandimento circa 1750 volte.)

poco. Il terzo disegno è particolarmente interessante anche perché fa vedere il comportamento tipico delle ortospirali composte, secondo KUWADA (1939, pag. 215). Infatti quello che questo Autore denomina ortospirale composta (cioè spirale formata da filamenti ortospirali elementari) è quella figura che — svolgendosi — dà origine a incrociamenti tra i filamenti elementari stessi, incrociamenti che, a loro volta, si disfano.

#### VI. Endomitosi nelle cellule «nutricie» dell'utero.

Nell'utero di *Artemia salina* si nota un grappolo di 10—30 cellule poliedriche assai grandi, poste nella parte mediana dell'organo. Non sono chiare né la loro origine né la loro funzione. Vengono indicate — per analogia con altre cellule affini, descritte per non poche specie di Insetti (per es. *Musca vomitoria*, VERHEIN, 1922, *Apis mellifera*, HEGNER, 1915; *Dytiscus marginalis*, GÜNTHER, 1920) e di Crostacei (per es. *Daphnia*) — col nome di «cellule nutricie». Non interessa per il nostro problema di chiarire il loro significato fisiologico, perciò — anche se ritengo poco giustificato il nome — lo mantengo per facilitare l'esposizione.

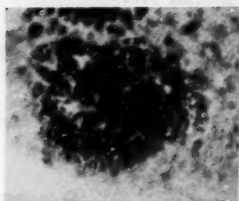
Queste cellule sono degne di nota perché contengono nel nucleo (sferoidale o in forma di bisaccia, talvolta duplice) un numero altissimo di cromosomi, sempre assai colorabili, che non mostrano mai forma filamentosa (fig. 14). Lo studio della struttura di questi nuclei è stato fatto ampiamente non solo coll'acetocarminio, ma anche coll'Ematossilina ferrica in sezioni di 5—7  $\mu$ , perché la grande massa di cromosomi spesso non si distribuisce in elementi isolati nei preparati per schiacciamento. Tuttavia, con tempi prolungati fino a due ore di soggiorno nel carminio

acetico, si possono avere degli ottimi preparati, che mostrano forme che di solito non si vedono dopo la colorazione coll'ematossilina ferrica.

Anche in *Artemie* giovani, con utero ancora vuoto di uova, i cromosomi delle cellule nutrici hanno già i caratteri che verranno ora descritti; la loro differenziazione è perciò precoce, e, sebbene io non l'abbia seguita a fondo, deve essere rapida. Durante la maturazione delle uova, le cellule nutrici si accrescono mediante processi di endomitosi.

Nelle femmine immature e adulte (ma soprattutto nelle prime) si osservano tre figure cromosomiche, che corrispondono a tre stadi raffigurati ali n. 1, n. 2 e n. 3 della fig. 15.

Fig. 14. Cellula «nutrice» dell'utero. Sezione di 7  $\mu$ , colorata con emat. ferrica. (Ingrandimento circa 120 volte.)



Lo stadio più frequente (quello del n. 1 della fig. 15) mostra i cromosomi in forma quasi discoidale irregolare, piuttosto pallidi:

è certo difficile dire a che cosa corrisponda questa fase, ma, siccome è la più frequente, si può pensare che rappresenti quella di riposo.

Ci si domanda allora che disposizione assume il cromonema, che non si può pensare scomparso per il fatto che in altre due fasi compare molto

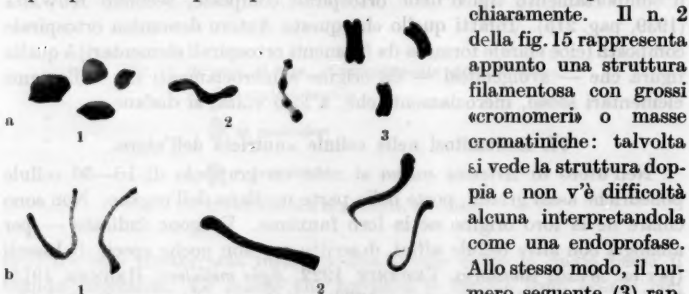


Fig. 15a e b. Endomitosi in cellule «nutrici» dell'utero: a femmine immature e adulte: 1 riposo; 2 endoprofase; 3 endometafase; b femmine adulte: 1 forma pallida a contorni indecisi; 2 forma fortemente colorabile. (Ingrandimento circa 1750 volte.)

chiaramente. Il n. 2 della fig. 15 rappresenta appunto una struttura filamentosa con grossi «cromomeri» o masse cromatiniche: talvolta si vede la struttura doppia e non v'è difficoltà alcuna interpretandola come una endoprofase. Allo stesso modo, il numero seguente (3) rappresenta una tipica endometafase. I cromosomi sono nettamente divisi nei due cromatidi;

che sono bastoncini diritti, senza traccia di spiralizzazione visibile. Essi sono di lunghezza molto uniforme, che oscilla intorno ai 3  $\mu$ . Questo è l'unico caso di forte contrazione senza spiralizzazione visibile nei cromosomi di *Artemia*, da me finora studiati.

Questa non è però l'unica serie di stadi che si riscontra in queste cellule dell'utero.

Nelle femmine adulte si vedono sovente nuclei con cromosomi nettamente filamentosi: o pallidi, a contorni netti ed a estremità appuntite

e uncinata, diritti o con una svolta, mai spiralati o a complicate sinuosità. Non compare alcuna spaccatura mediana.

Interpreto queste forme come caratteristiche delle cellule vecchie, nelle quali non hanno più luogo endomitosi. Sarebbero — se è realmente così — forme finali che potrebbero anche degenerare, perdendo la propria individualità. Infatti, in qualche caso, non si può escludere che i diversi cromosomi siano uniti per le estremità, quasi a preludere a forme di anastomosi.

I fenomeni cromosomici di questo tipo di cellule sono tra i più notevoli, perché si distaccano da quelli osservati per altri tipi; infatti manca la despiralizzazione durante lo stadio di riposo e una spiralizzazione endoprofasica. Piuttosto che alla altre cellule di *Artemia*, sembrano assomigliare di più a quanto ha scoperto GEITLER (1937 e 1939) nei RINCOTI. In ambedue i casi infatti vi è poca differenza tra l'endometafase e il riposo.

Un problema non facile (che anzi non saprei risolvere) è quello della intima struttura dello stadio a figura tonda, quasi lenticolare, interpretato come stadio di riposo. O si pensa che il cromonema sia andato completamente disfatto, e questo è poco verisimile per la ragione fondamentale che sembra poi difficile di spiegare la neoformazione del cromonema stesso nella profase, oppure si può ritenere che il cromonema sussista, ma avvolto nell'interno del cromosoma, in modo certo molto complesso, data la forma esterna di quest'ultimo. Infine si può supporre che la forma lenticolare e discoidale irregolare sia prodotta solo dal rivestimento di matrice, e che nell'interno vi sia il cromonema nella condizione usuale.

Il numero di endomitosi che ha luogo successivamente in una cellula nutrice è senza dubbio piuttosto elevato, perché i cromosomi contenutivi sono parecchie centinaia. Siccome però non si riesce a mettere bene in evidenza i nucleoli, non sono giunti a fare un conteggio approssimativo, neppure indiretto.

#### VII. La struttura dei nuclei dell'epitelio intestinale.

Le cellule dell'epitelio intestinale si differenziano con una propria struttura nucleare durante il *Metanauplius III* con un andamento particolarmente poco sinuoso dei filamenti cromosomici, che sono ben chiari, piuttosto colorabili e mostrano pochissimo i cromomeri. Nell'adulto i caratteri non cambiano sostanzialmente (non si osserva l'aumento di cromaticità allo stadio di *Metanauplius IV*), e solo lo spessore dei filamenti è meno uniforme, anche se non si può parlare di comparsa di ingrossamenti veri e propri (fig. 16).

Le mitosi — di tipo abbreviato — sono frequenti anche nelle *Artemie* giovani. Nell'adulto sono eccezionali o mancano del tutto. Endomitosi vere e proprie, non ne ho viste; pure — sporadicamente — qualcuna deve

aver luogo, perché si trovano qua e là cellule tetraploidi in *Artemie* diploidi, e octoploidi in *Artemie* tetraploidi, come almeno sembra indicare il numero dei nucleoli.

In complesso si può dire che i nuclei dell'epitelio intestinale mantengono molto i caratteri delle cellule del *Metanauplius II e III* e presentano scarsa varietà di struttura nucleare, con manifestazioni parziali e sparse di poliploidismo somatico.

In parecchie *Artemie* di età già avanzata si osserva una più o meno diffusa degenerazione della struttura nucleare, che diventa reticolo-vacuolare, cioè con vacuoli chiari,

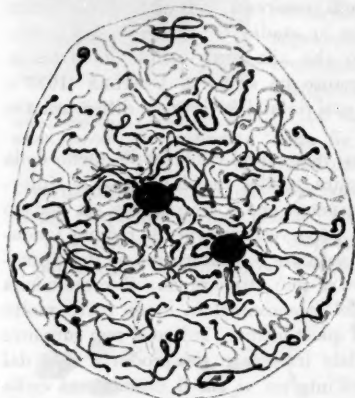


Fig. 16. Nucleo di cellula epiteliale dell'intestino. (Ingrandimento circa 1750 volte.)

delimitati da briglie cromatiniche, che sembrano anastomizzarsi tra loro. Probabilmente si tratta di una perdita della struttura primitiva in seguito a invecchiamento: un fenomeno simile osservò GEITLER in *Gerris* (1939).

#### VIII. La struttura del nucleo in riposo e dell'endomitosi delle cellule del tegumento.

Le cellule del tegumento (cellule ipodermiche) sono elementi dal nucleo ovale, che durante l'ontogenesi mantengono una notevole costanza di struttura. Infatti, durante lo

sviluppo, presentano sempre un aspetto filamentoso, che perdura anche durante lo stadio adulto, quando ormai la cuticola chitinoso si è completamente formata: questa però si mantiene sempre assai sottile. L'unico fatto particolare che si nota allora è una scarsa cromaticità, che si dimostra anche colla reazione di FEULGEN. I nucleoli si vedono male, ma io sarei inclinato a credere che le endomitosi siano rare, e conseguentemente rare le cellule poliploidi, fatta eccezione per quelle dell'arto.

Queste sono gli elementi che costituiscono la parte fondamentale delle undici paia di arti, formando una lamina rinforzata da numerose fibre muscolari disposte a ventaglio, come si vede dalla fig. 12. Lungo il margine dell'arto, le cellule hanno una diversa struttura nucleare, di cui diremo tra poco.

La struttura del nucleo in riposo delle cellule che si trovano nella porzione centrale dell'arto è a filamenti sinuosi assai sottili. La endoprofase precoce si annunzia con una perdita delle sinuosità e colla

comparsa di piegheature o spirallature sottilissime (spirali profasiche), (fig. 17 n. 1). In seguito (profase tardiva), un arricchimento di matrice, che si colora tuttavia pallidamente, riveste il tutto e maschera le spirali sottili: non è da escludere che si verifichi anche una scomparsa parziale delle spirali stesse, poiché questo stadio (n. 2 della fig. 17) mostra dei

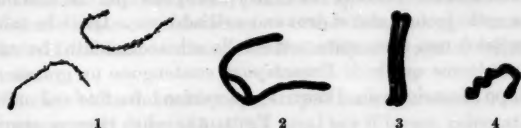


Fig. 17. Endomitosi nelle cellule di rivestimento degli arti. 1 riposo; 2 endoprofase tardiva; 3 endometafase; 4 forma di endometafase con parziale spiralizzazione. (Ingrandimento circa 1750 volte.)

cromosomi piuttosto lunghi. La spaccatura mediana è evidentissima e in alcuni casi è già iniziato un allontanamento dei cromatidi. Forse questa è già una endometafase, nel senso che il fenomeno di contrazione è già al massimo. Però c'è anche qualche esempio di parziale spiralizzazione a spire larghe (n. 3 della fig. 17), che è pure una endometafase molto affine a quella delle endomitosi di I ordine dei nuclei muscolari.

In complesso questa endomitosi assomiglia assai a quella di I ordine degli elementi muscolari: è tipico però lo stadio 2° a cromosomi lunghi, a bastoncini divisi, pallidi e sottili.

In alcune zone del corpo, specialmente lungo il margine posteriore dell'arto, si osserva invece un altro fatto: un rimaneggiamento della struttura nucleare, in modo da dare origine ad un reticolo: qui si ha dunque un esempio di quella che si chiama struttura reticolare. I filamenti sono (fig. 18) di spessore variabile e si intersecano con angoli acuti più o meno ampi. Le maglie del reticolo sono larghe e talvolta assumono aspetto di alveoli. Questi nuclei sono piccoli, e non mostrano mai fenomeni endomitotici: sembra dunque di dover concludere che la struttura reticolare compare solo là dove non hanno luogo quei fenomeni di divisione che presuppongono l'allineamento dei geni e la indipendenza dei singoli cromosomi.



Fig. 18. Nucleo del tegumento con struttura reticolare. (Ingrandimento circa 1750 volte.)

Struttura analoga è stata vista recentemente nell'epitelio intestinale di *Gerris* da GEITLER (1939) e da SHARP (1929) in cellule capaci di dividersi

di diverse piante; quest'ultima affermazione è però posta in dubbio da alcuni (NAITANI, 1937, secondo KUWADA, 1939).

#### IX. La struttura del nucleo negli elementi circolanti e in cellule connettive.

I Fillopodi in genere sono provvisti di emolinfa ricca di elementi figurati, denominati linfoidi, che si rinvencono più facilmente nelle branchie o nelle lacune che si trovano nell'addome. Quando tali cellule sono intere (cioè non sono state rotte dallo schiacciamento) hanno forma tondeggiante (come quelle di *Branchipus*), contengono un grande vacuolo pallido (dopo fissazione in Bouin e colorazione *in toto* col metodo di

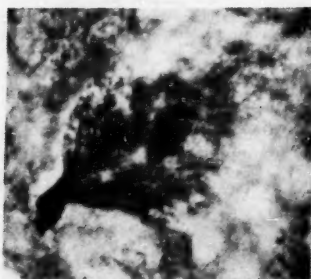


Fig. 19. Nucleo a mazzo di fiori.  
(Ingrandimento circa 500 volte.)

FEULGEN) che ritengo corrisponda ai vacuoli ricchi di grassi, osservati da ARTOM (1927). La struttura del nucleo è estremamente singolare, e merita una descrizione accurata.

Quando i nuclei sono interi, si nota un grosso corpo tondeggiante, assai colorabile, che dimostra di non essere un nucleolo perché reagisce in modo fortemente positivo col metodo di FEULGEN; da esso si dipartono dei filamenti pure cromatici. Però la cellula non schiacciata non lascia vedere quasi nulla, anche perché il nucleo appare deformatissimo dal

grande vacuolo del citoplasma. Una osservazione veramente completa (v. fig. 19) si può fare solo dopo schiacciamento; la colorazione col carminio serve ottimamente. Allora si vede che il nucleo contiene un mazzo di cromosomi filamentosi, che si dispongono come il «bouquet» descritto per la meiosi. Essi sono tenuti assieme ad un estremo dalla massa tondeggiante che si osserva anche nel nucleo intero, e si dipartono da essa l'uno indipendentemente dall'altro: il loro decorso è, in un primo tratto, parallelo: più avanti — verso l'estremità libera — essi si intrecciano, senza formare — a quello che sembra — vere anastomosi. Ci sono dei casi nei quali il tratto a fascio di filamenti paralleli è più evidente, e altri nei quali esso è ridottissimo. Ogni filamento è ben colorabile: non mostra cromomeri durante il tratto a decorso rettilineo, e, solo più avanti, si ingrossa qua e là in noduli tondeggianti. Per sintetizzare l'impressione che si riceve dall'osservazione di queste figure singolari, mi varrei del termine di «nuclei a mazzo di fiori» analogamente a quello che si è fatto per il ben noto stadio della meiosi. Non si osservano nucleoli: i filamenti cromosomici sono lunghissimi (fino a circa  $30,0\mu$ ). Non mi riuscì di procedere ad un loro conteggio, perciò ignoro se si tratta di nuclei a poliploidismo somatico.

Vediamo ora come interpretare quanto siamo venuti esponendo. Premetto che una simile struttura non è stata ancora descritta da alcuno, e si comprende perché: è solo il metodo dello schiacciamento — introdotto da poco nella tecnica citologica — che può permettere di vedere il contenuto nucleare intero e liberato dalla costrizione della membrana. ARTEM (1927) ricorda che BRUNTZ (1905) pensa che questi nuclei siano accresciuti per «divisioni dirette», o endomitosi — come diciamo oggi —, ma afferma anche che tali divisioni — almeno in *Branchipus* — non si vedono. Altro non è noto.

Quello che risulta dai miei preparati può essere riassunto così: i cromosomi appaiono privi di spirali, stirati assai per il lungo, orientati in modo da formare un fascio parallelo, che poi si apre quasi a ventaglio. Questa forma a ventaglio però risulta dopo lo schiacciamento, mentre il poco che si può vedere in un nucleo intero fa pensare ad anse simili a quelle del «bouquet» meiotico. Il punto nel quale i cromosomi sono uniti è ricco di matrice, che riveste le terminazioni cromosomiche in modo da formare una massa unica, che può essere rassomigliata ad un nucleolo.

Interpretata in questo modo, la struttura di questi nuclei non è priva di analogia con quella dei nuclei di tipo salivare dei Ditteri. Il carattere comune con quelli è l'allungamento dei cromosomi e la mancanza di vere spiralizzazioni, mentre i caratteri differenziali sono dati dalla mancanza, nell'*Artemia*, di sinapsi somatica, che non permette la formazione di cromosomi poliploidi di proporzioni gigantesche, e la presenza (sempre nell'*Artemia*) di un certo rivestimento di matrice che maschera i cromomeri.

Un punto di apparente somiglianza tra i due tipi di nuclei è rappresentato dalla massa che tiene uniti i cromosomi per un'estremità. Nei cromosomi salivari di tipo *Drosophila*, ne troviamo una simile: il cromocentro. Se in *Artemia* si tratti di un cromocentro non è certo, ma deporrebbe in favore della sua natura eterocromatica la reazione di FEULGEN positiva. In questo caso i frammenti di cromosomi lievemente eteropienotici osservati nei nuclei vicino al nucleolo, potrebbero comparire qui fusi assieme in una sola massa. Se questi nuclei sono interessanti perché rappresentano un caso in certo modo paragonabile a quello del tipo salivare dei Ditteri, è degna di considerazione anche la somiglianza collo stadio di «bouquet» che fino ad oggi è considerato tipico della fase sinaptica della meiosi.

Un ultimo tipo di cellule da considerare è quello che si trova nella membrana posta alla base dell'epitelio intestinale. Si tratta di cellule dalla forma irregolare, di natura connettivale. Certamente queste sono diffuse anche in altre parti del corpo, però sono evidenti qui più che altrove. Disgraziatamente sussiste la difficoltà di isolarle completamente dall'epitelio, e quasi sempre anzi ciò non riesce nei preparati all'acetocarminio. Invece, dopo fissazione in Bouin e colorazione *in toto* con Ematossilina di EHRlich,

si può separarle dall'epitelio: con questa tecnica, però, si produce una forte riduzione di dimensioni, che non permette poi l'esame strutturale del nucleo. Il poco che si vede è traducibile nella seguente descrizione: nuclei piccoli, sferici o quasi, con struttura assai compatta; sembra di scorgervi dei filamenti estremamente avvicinati tra loro.

Vi saranno sicuramente ancora altri tipi di cellule connettivali o anche di altra natura citologica, sfuggite a questa indagine. Come giustificazione delle lacune, si può tenere presente che mi sono mancati modelli di ricerche analoghe, a cui io potessi riferirmi.

### Considerazioni Generali.

Per riassumere quanto abbiamo esposto finora, credo che il mezzo migliore sia di rappresentare sistematicamente le forme cromosomiche osservate in una tavola sinottica (fig. 20), che risparmierà una lunga ripetizione di cose già dette.

Dall'esame di detta tavola risulta che la differenza principale tra i cicli endomitotici e il ciclo mitotico risiede nella maggior contrazione della metafase in confronto con la endometafase; anche la spiralizzazione è più evidente nella mitosi che non nella endomitosi.

Tra i diversi cicli endomitotici troviamo una diversa manifestazione della spiralizzazione e della contrazione; spirali non si vedono nelle cellule nutrici dell'utero; sono chiare nelle endomitosi delle cellule branchiali, e meno marcate in quelle di I° ordine delle cellule muscolari e gangliari.

La struttura filamentosa nei cromosomi in riposo manca talvolta (nelle cellule nutrici dell'utero, nelle quali pure le endomitosi sono frequenti), ma costituisce la forma più comune.

In tutte le endomitosi e mitosi gli stadi di massima contrazione sono certamente ricchi di matrice, fortemente colorabili, a contorni netti, con cromomeri mascherati.

Credo che queste osservazioni possano portare un contributo al problema delle cause determinanti la spiralizzazione, intorno alle quali ferve tuttora una vivace discussione.

Ricordiamo anzitutto quello che è stato affermato dai diversi AA.

I° — *Teorie della spiralizzazione mediante la contrazione della matrice:* secondo questa veduta, dei due componenti del cromosoma, la catena dei geni e la matrice, la prima sarebbe passiva e la seconda si contrarrebbe avvolgendo la prima ad elica (SAX e HUMPHREY, 1935). Oppure: le catene dei geni (cromatidi o mezzi cromatidi) sarebbero originariamente avvolte in avviticchiamenti le une sulle altre; ad un certo punto esse si accrescerebbero per idratazione, per esempio) ed allora si svolgerebbero gli avviticchiamenti. Questo svolgimento si attuerebbe per mezzo dell'avvolgimento a spirale, regolato e diretto nella sua formazione, dalla

Mitosi Nauplius	Mitosi Metanauplius	I ord.	Endomitosi I ord.	Endomitosi II ord.	Endomitosi branchia	Endomitosi tegumento	Endomitosi cellule nutritive dell'utero

Fig. 20. Schema riassuntivo generale.

matrice (KUWADA, 1937 e 1939). Secondo l'ipotesi di quest'ultimo A. la matrice avrebbe una funzione solo parziale nel determinare la spiralizzazione.

Infine, secondo WILSON e HUSKINS (1939), il cromonema sarebbe chiuso in una pellicola, e si avvolgerebbe a spirali per la costrizione della pellicola indeformabile, mentre il cromonema si allungherebbe durante la profase verso la metafase. L'accrescimento del cromonema sarebbe disuguale nei diversi suoi settori<sup>1</sup>.

II° — La teoria che si basa invece sulla spiralizzazione interna della catena dei geni (e prescinde dalla forza coattiva della matrice) è stata elaborata da DARLINGTON (1935), che vede nella spirale cromosomica osservabile durante la profase la visibilizzazione di un fenomeno che si inizia colla formazione di una spirale invisibile delle molecole geniche e intergeniche: la spirale molecolare.

Recentemente NEBEL (1939) ha elaborato ancora un'altra teoria nella quale il concetto di DARLINGTON viene ad essere ripreso insieme con concetti già espressi da WILSON e HUSKINS. In sostanza NEBEL considera la catena dei geni come se fosse costituita di porzioni (nemameri) indipendenti, che al momento della riproduzione andrebbero incontro ad un accrescimento più intenso in alcuni punti (accrescimento eterogonico, cioè in settori diversi, già asserito da WILSON e HUSKINS). Stabilitosi questo, si verificherebbe un ordinamento dei nemameri in modo da essere tutti orientati nella stessa direzione dello spazio: come vien dimostrato da uno schema di questo Autore, si arriverebbe alla formazione di un'elica dapprima a giri rilasciati, che si contrarrebbero successivamente.

Tutte queste teorie prestano più o meno il fianco a qualche critica. Senza pretendere di giudicarle a fondo, mi limiterò a notare che le vedute di SAX e HUMPHREY presupporrebbero una despiralizzazione completa quando non c'è matrice, ciò che non è provato.

D'altra parte, per sostenere la tesi di WILSON e HUSKINS, è necessario supporre che i cromosomi si allungino durante la profase, ciò che serve pure alla tesi di NEBEL; ma questo fatto non si può dire dimostrato dalle osservazioni di molti AA., come lo stesso NEBEL fa notare.

La teoria di DARLINGTON, se in parte può essere accolta e se indubbiamente è elaborata con un notevole grado di genialità, cozza contro un grave ostacolo: se gli avvolgimenti a spirale fossero determinati da strutture spirali di ordine molecolare, come concepire una spiralizzazione destrorsa o sinistrorsa causalmente variabile, come si osserva in molti casi sicuri? Sappiamo infatti che le proprietà di un composto variano notevolmente a seconda della sua struttura destrorsa o sinistrorsa, e dovremmo perciò assistere a variazioni ereditarie a seconda del senso dell'avvolgimento delle spirali, ciò che non è menomamente provato dall'esperienza.

La teoria di KUWADA riesce a soddisfare di più — almeno ad una considerazione *a priori* — perché meno semplicista e tiene conto di due

<sup>1</sup> Si immagina il cromonema come un cilindro, nel quale qualche settore cresce di più del rimanente. Questo fenomeno è chiamato da STRAUB (1939) «accrescimento unilaterale» (*einseitiges Wachstum*, 1939).

diversi fattori, uno interno (l'avvicchiamento dei cromonemi) e uno esterno (la contrazione della matrice).

La debolezza di tutte queste teorie consiste nello scarso appoggio sperimentale: infatti due soli tipi di esperimenti sono stati condotti. Uno è quello, molto noto, di KUWADA e NAKAMURA (1934). Gli AA. hanno trattato con vapori di  $NH_3$  cellule in prometafase e stadi vicini, ed hanno osservato uno svolgersi delle spirali, e insieme una scomparsa della matrice. Da questo essi conclusero che l'ammoniaca aveva dissolto la matrice e che la scomparsa di questa aveva provocato lo spianarsi delle spire. L'interpretazione che KUWADA e NAKAMURA danno alla esperienza conduce ad ammettere una importante funzione alla matrice nel determinare le spirali. Però è possibile anche un'interpretazione antitetica, ammettendo precisamente che la spirale sia dovuta ad avvolgimenti di ordine molecolare, come afferma DARLINGTON, mantenuti a posto da gruppi atomici di collegamento. Un composto chimicamente attivo come l'ammoniaca potrebbe spostare tali gruppi atomici dalla loro posizione, spianando così le spirali senza che sia stata preventivamente sciolta la matrice: la scomparsa di questa può essere intesa come il disfarsi dello strato più esterno del cromosoma, in seguito alla distensione del cromonema interno. Per rendere sicura l'interpretazione di KUWADA, bisognerebbe dimostrare (ciò che non mi pare sia stato fatto ancora) che l'ammoniaca è un dissolvente specifico della matrice.

Io credo che oggi una vera esigenza della Citogenetica sia quella di scoprire con metodi sperimentali o morfologici quale sia (o quali siano) la causa o le cause determinanti della spiralizzazione, perché non sarebbe forse impossibile — conoscendo il tipo di fattore che la determina — raggiungere qualche nuova conoscenza sulla struttura fisicochimica dei cromosomi, oggi ancora quasi ignota. Le mie osservazioni, credo, possano in un certo qual modo dare un'idea di come si possa adoperare il metodo morfologico a questo scopo.

Prospettiamo anzitutto il problema: si tratta di dimostrare se la formazione della matrice esplica una funzione determinante nell'accorciamento dei cromosomi, fenomeno complesso in cui possiamo distinguere due elementi: 1° l'avvolgimento a spirale o ad elica che dir si voglia, e 2° la contrazione: il primo è la formazione della spirale od elica, il secondo è l'avvicinamento delle spirali stesse, e corrisponde — come ho già detto — a quello che DARLINGTON chiama *packing* (v. pag. 264 in nota).

Nell'*Artemia* vi è un esempio di accorciamento di cromosomi che non dimostrano spiralizzazione (questo è quello delle cellule nutrici dell'utero), che farebbe pensare addirittura ad un accorciamento dei cromosomi per altri meccanismi che non conosciamo, oppure per quella spiralizzazione invisibile invocata in casi affini da DARLINGTON.

Per il problema postoci è utile confrontare la mitosi con l'endomitosi di I° ordine riscontrata negli elementi muscolari e nervosi.

Nell'una e nell'altra vi sono due fatti comuni: la divisione dei cromosomi e la formazione della matrice. Quest'ultimo fatto è dimostrato chiaramente dalla forma che i cromosomi assumono e dalla loro colorabilità (confr. il n. 9 della fig. 6, e il n. 3 della fig. 11).

Essi dimostrano però anche un carattere tra loro differenziale: lo stadio metafase della mitosi (fig. 5) è spiralizzato, mentre quello della endomitosi (fig. 11) lo è pochissimo e in modo irregolare e parziale, al punto da non comparire neppure in certi casi.

Possiamo allora concludere che la matrice può in determinati casi formarsi senza determinare una vera spiralizzazione, e perciò che la spiralizzazione può essere indipendente dalla formazione della matrice.

Il paragone tra la mitosi (che ha la spiralizzazione) e l'endomitosi (che quasi non ne ha) è particolarmente convincente, io credo, perché si tratta di due fenomeni osservati nella stessa specie, anzi nello stesso individuo.

Tuttavia è possibile sollevare una obiezione. Si può pensare che nella endomitosi la spiralizzazione non avvenga o sia appena accennata perché la matrice è più scarsa che nella mitosi. Se questa supposizione corrisponda a verità non sappiamo, perché non si può misurare la quantità della matrice. Però se una differenza di quantità di matrice c'è, si potrà tutt'al più pensare che la matrice collabori alla formazione delle spirali, ma non si potrà ugualmente sostenere che essa è la sola determinante della spiralizzazione, come vorrebbero SAX e HUMPHREY dal momento che nelle cellule delle branchie, la matrice sembra scarta, e le spirali sono spesso chiarissime.

Secondo me, la teoria di SAX e HUMPHREY sarebbe dunque da respingere, mentre rimarrebbe possibile un accordo con quella di KUWADA. Infatti — come si disse — essa riconosce alla matrice solo un'azione regolatrice dell'andamento delle spire e nel loro mutuo avvicinamento, ma ritiene che la spiralizzazione in forma ortospirale<sup>1</sup> proceda da uno stadio precedente alla formazione della matrice con avvolgimenti ad avvicchiamento tra i cromatidi, che io ho osservato (anche se con difficoltà) in qualche caso di spirali profasiche.

La teoria di WILSON e HUSKINS invoca l'esistenza di una pellicola sottilissima che rimarrebbe indeformata mentre i cromomeri aumenterebbero di lunghezza; io non ho mai visto questa pellicola e neppure so se si possa omologare alla matrice. Certo non ho alcun elemento per provare un allungamento dei cromosomi durante la profase, ed anzi a pag. 16 esprimo l'opinione che esso non avvenga, anche in base ad una misurazione.

Con questi elementi tendo a negare l'importanza esclusiva della matrice nella formazione delle spirali, anche se non giungo a poter dare un ap-

<sup>1</sup> Definizione di ortospirale (KUWADA, 1939, op. cit. pag. 215): una spirale che si forma per rotazione di un filo che abbia una estremità libera. Il caso di filamento con ambedue le estremità fisse darebbe un'anortospirale.

poggio alla ipotesi della spiralizzazione prodotta da fattori interni, secondo DARLINGTON o NEBEL. Quest'ultima teoria (di NEBEL) è più convincente della prima, ne rimuove le obiezioni, e potrebbe essere anche notevolmente vicina al vero, se venisse dimostrato che non esistono gli avviticchiamenti iniziali tra cromatidi, visti o postulati da KUWADA o solo intravisti da me. Io non ho elementi originali e sicuri per dirimere la questione. Possiamo ora passare ad un'altra considerazione.

Durante la mitosi ha *sempre* luogo un fortissimo accorciamento che non è uguagliato mai da alcuna endomitosi (dove pure vi è un modico accorciamento) anche se quella — piuttosto strana — che si riscontra nelle cellule nutrici dell'utero vi si avvicina (v. Tavola riassuntiva). Da questo dato di fatto si possono ricavare due conseguenze:

1° la spiralizzazione non è regolare e costante, e non è seguita da avvicinamento delle spirali (contrazione) quando non si verifica il fenomeno della formazione del fuso e della divisione cellulare.

2° la produzione della matrice accorcia un poco i cromosomi, anche quando non si osservano spirali.

Si potrebbe dunque concludere che il massimo accorciamento dei cromosomi, è legato alla formazione del fuso, mentre un modico accorciamento può in parte essere indipendente, tanto dalla spiralizzazione quanto dalla formazione del fuso.

Di che tipo possa essere il rapporto tra la formazione del fuso e la contrazione cromosomica non saprei dire.

Per valutare la portata generale di questo modo di vedere il fenomeno, è necessario che su parecchie specie venga determinato se l'accorciamento mitotico e quello endomitotico sono differenti tra loro. Il solo caso finora ben studiato, quello dei RINCOTI (GEITLER) sembra corrispondere a quello di *Artemia*, ma questi pochi esempi non sono certo sufficienti.

Infine dobbiamo ricordare che nel caso delle cellule «nutrici» dell'utero non si riesce a spiegare l'accorciamento dei cromosomi mediante la formazione di spirali e il loro ravvicinamento: qui si può supporre o che le spirali ci siano anche se non si vedono, oppure che l'accorciamento sia determinato da un avvicinarsi delle micelle di cui il cromosoma consta, o da perdita di acqua o da altro fatt del genere. È bene tenere presente che oggi la tendenza generale è volta a spiegare l'accorciamento dei cromosomi durante la divisione come prevalentemente connesso alla spiralizzazione.

#### Conclusioni principali.

1° Le *Artemie* diploidi e tetraploidi presentano il fenomeno della poliploidia somatica, caratteristica per il tessuto muscolare, nervoso, le cellule «nutrici» dell'utero, alcune parti del tegumento e le cellule della branchia (epipodite).

2° Le mitosi osservate sono di due tipi: con profase a spiralizzazione visibile e con profase abbreviata con spiralizzazione invisibile (mancante?).

I cromosomi della mitosi sono granuliformi e quasi uguali tra loro durante la metafase. Durante la profase precoce sono filamentososi, con forti disparità di lunghezza. Due coppie nell'assetto diploide sono di tipo SAT, e producono un nucleolo.

Le mitosi con spirali profasiche sono limitate allo stadio di *Nauplius*.

3° I nuclei in riposo hanno struttura filamentosa, cioè i cromosomi sono sempre più o meno facilmente individuabili come filamenti, tranne in pochi casi di nucleo a struttura alveolare (cellule tegumentali) o nelle cellule «nutricie» dell'utero, dove i cromosomi hanno la forma di zolle quasi discoidali. Durante lo sviluppo si osserva che i cromomeri si rendono più visibili, poi una perdita di cromaticità, infine una cromaticità più intensa con modico rivestimento di matrice.

4° Dallo stadio di *Nauplius* tardivo in avanti si intensifica lo svolgersi di endomitosi, con aspetti tipici in organi e tessuti diversi, notevoli per cromosomi a contorni netti, meno contratti che nella mitosi. Non si osservano mai mitosi in cellule a poliploidismo somatico.

#### Opere citate.

- Artem, C.: Arch. Zellforsch. 9, 87 (1912). — Internat. Rev. d. Hydrobiol. 16, 51 (1926). — Rend. Accad. Lincei, Cl. Sci. fis. mat. e nat. 6, 6, 257 (1927). — Barigozzi, C.: Atti Soc. ital. Sci. Nat. 78, 137 (1939). — Bauer, H.: Z. Zellforsch. 23, 280 (1935). — Zool. Jb., Allg. Zool. 56, 239 (1936). — Naturwiss. 26, 77 (1938). — Bölar, K.: Z. Zellforsch. 10, 73 (1929). — Berger, C. A.: Publ. Carnegie Inst. Washington 496, 209 (1938). — Caspersson, T.: Naturwiss. 29, 33 (1941). — D'Ancona, N.: Monit. zool. Ital. 50, 225 (1939). — Darlington, C. D.: Proc. roy. Soc. Lond. B. 118, 33 (1935). — Recent Advances in Cytology. London: J. and A. Churchill 1937. — Darlington, C. D. and M. B. Upcott: Chromosoma 1, 23 (1939). — Gelder, L.: Chromosomenbau. Berlin: Gebr. Borntraeger 1938. — Chromosoma 1, 1 (1939). — Heitz, E.: Planta (Berl.) 12, 774 (1931). — Hugues-Schrader, S.: Z. Zellforsch. 13, 509 (1931). — Kuwada, Y.: Cytologia, Fujii Jub.-vol. 389, 1937; 10, 213 (1939). — Kuwada, K. and L. H. A. Stone: J. Genet. 28, 1 (1933). — Nebel, B. R.: Amer. Naturalist 73, 289 (1939). — Nebel, B. R. and M. L. Ruttle: Coll. Net (estratto) 12 (1937). — Painter, T. S.: Genetics 26, 163 (1941). — Painter, T. S. and A. B. Griffen: Genetics 22, 612 (1937). — Painter, T. S. and Reindorp E. C.: Chromosoma 1, 276 (1939). — Sax, K. and L. M. Humphrey: Botanic. Mag. 96, 353 (1935). — Shigenaga, M.: Cytologia Fujii Jub.-vol. (Cit. da Kuwada 1939) 1937. — Schröder, C.: Handbuch der Entomologie. Jena: Georg Fischer 1928. — Sharp, L. W.: Bot. Gaz. 88, 349 (1929). — Sinke, N.: Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ. Ser. B 15, 1 (1939). — Straub, J.: Z. Bot. 33, 63 (1939). — Wada, B.: Cytologia 7 (1936). Cit. da Kuwada 1939. — White, M. J. D.: The Chromosomes-Methuen and Co. London: 1937. — Wilson, G. B. and C. L. Huskins: Ann. Bot. N.S. 2 (1939). Cit. da Nebel, 1939.

(Dell'Istituto di Zoologia della R. Università di Milano.)

L'AZIONE DELLA COLCHICINA SULLA MORFOLOGIA E SULLA  
STRUTTURA DEI CROMOSOMI, STUDIATA NELLE CELLULE  
SOMATICHE DI *ARTEMIA SALINA* LEACH.

Di

CLAUDIO BARIGOZZI.

(Con 16 figure nel testo.)

(Eingegangen am 30. März 1942.)

**Introduzione.**

L'azione della colchicina sulla mitosi può essere studiata sotto tre aspetti:

- 1) come alteratrice del fuso
- 2) come modificatrice della forma e della struttura dei cromosomi
- 3) come stimolatrice alla mitosi.

Lo scopo di questo lavoro è di illustrare l'azione della colchicina sulla forma e sulla struttura dei cromosomi somatici di *Artemia salina*; esso rientra perciò nel secondo e nel terzo punto, dei tre che abbiamo ora elencato, e non nel primo. È poi chiaro che l'analisi delle variazioni dell'aspetto dei cromosomi si connette alla questione della stimolazione colchicina della mitosi, quando si tenga conto dei fatti seguenti. La stimolazione vera e propria alla mitosi (come l'ha sostenuto DUSTIN) consiste — intesa secondo le teorie oggi generalmente accolte — in un eccitamento alla spiralizzazione, alla contrazione, al rivestimento di matrice dei cromonemi e al dissolvimento della membrana nucleare e dei nucleoli, quando sia preventivamente avvenuta una divisione longitudinale dei cromonemi stessi, che a sua volta presuppone la riproduzione dei geni; questa azione può essere denominata *carioclastica* secondo DUSTIN, cioè dissolvitrice del nucleo, ed è stata negata dalle ricerche di BUCHNER (1939). È stata poi descritta un'altra forma di azione stimolante (RIES 1939), che parrebbe caratteristica della *Periplaneta*, consistente in una „visibilizzazione“ dei cromosomi in nuclei in riposo (nei quali i cromosomi stessi non si vedono normalmente), senza fenomeni di dissolvimento della membrana nucleare. Sebbene RIES non dica esplicitamente di intendere la visibilizzazione dei cromosomi come effetto di spiralizzazione e formazione di matrice sui cromonemi, è chiaro che — colla terminologia oggi in uso — il fenomeno da lui osservato specialmente nelle cellule dell'epitelio intestinale di *Periplaneta* deve essere interpretato come uno stimolo, esplicato dalla colchicina, alla spiralizzazione, alla

contrazione e alla formazione di matrice. Anzi, RIES afferma che la colchicina: „in erster Linie auf die Chromatinstrukturen wirkt„ (1939, pag. 510).

Per ciò che si riferisce alla modificazione di forma dei cromosomi indotte dalla colchicina durante la mitosi, che si arresta per le alterazioni che insorgono nel fuso, sono riuscito a rintracciare tre soli gruppi di ricerche: uno di LEVAN (1938, 1939) su *Allium*, uno di SOKOLOV (1938) su *Chorthippus* (Ortottero), e uno di O'MARA (1939) su *Allium*, *Triticum*, e altre specie.

LEVAN individua un particolare avviticchiamento dei cromatidi l'uno sull'altro dopo la metafase (dunque corrispondentemente alla anafase), simulante una terminalizzazione di chiasmi dovuta al ritardo nella divisione del centromero, che normalmente avviene alla metafase. Inoltre — analizzando la meiosi — osserva la mancata despiralizzazione alla fine della I mitosi di maturazione, e una riduzione della frequenza dei chiasmi.

SOKOLOV osserva un variare dell'apertura dell'angolo dei cromosomi a V, che assumono una figura a U o addirittura diventano rettilinei, mentre le costrizioni primarie acquistano l'aspetto di un ponte. Questi due fatti possono forse essere interpretati come variazioni nello stato della matrice, onde il cromosoma diventa meno rigido; invece la spiralizzazione non sembra essere alterata, dato che non risultano variazioni della lunghezza dei cromosomi.

O'MARA nota un disfarsi di quegli avvolgimenti tra i cromatidi che si osservano normalmente nelle specie da lui studiate fino alla metafase. Si tratta, però, qui di un fatto dovuto solamente al passaggio lento e graduale dei cromosomi metafasici allo stadio despiralizzato della telofase. In questo caso dunque non si può parlare — credo — di una vera e propria azione diretta della colchicina sulla struttura dei cromosomi.

Possiamo dunque concludere che, secondo gli Autori citati, la colchicina agisce sul cromosoma mitotico modificando: a) la distribuzione e le proprietà della matrice (SOKOLOV, in *Chorthippus*); b) la formazione della matrice e la spiralizzazione, almeno in parte (RIES, in *Periplaneta*); c) il momento di divisione del centromero e la spiralizzazione (LEVAN, in *Allium*).

Considerando la scarsità di questi dati, desunti da materiale assai disparato, ho creduto interessante di eseguire una ricerca sulle cellule somatiche di *Artemia salina* LEACH., nelle quali si riscontrano numerosi fenomeni cromosomici, che già illustrai nel lavoro precedente (BARIGOZZI 1942) e che riassumo brevemente, salvo a dare più avanti qualche particolare:

a) *Mitosi*: nel *Nauplius* si riscontra una spiralizzazione molto chiara, che può essere distinta in una iniziale a piccole spire numerose, e una successive a spire più ampie. L'accorciamento dei cromosomi durante la profase è fortissimo. Inoltre la formazione di matrice è tanto abbondante da mascherare totalmente la spiralizzazione durante la prometafase.

b) *Endomitosi*: si riscontra questo fenomeno in molti tessuti ed organi; la spiralizzazione a grandi spire è scarsa o mancante, ma la formazione di matrice è notevole (ispessimento dei cromosomi, che mantengono anche nella endometafase quasi la stessa lunghezza che hanno nella profase precoce).

c) *Formazione di matrice*, indipendentemente da fatti cariocinetici, con ingrossamento dei cromonemi, in momenti determinati dello sviluppo (*Metanauplius I e IV*).

Questi fatti permettono di ritenere l'*Artemia* un materiale favorevole tanto allo studio della formazione della matrice, quanto a quello della spiralizzazione e della contrazione, perciò ho creduto opportuno di estendere la mia ricerca anche alla azione della colchicina in forti concentrazioni sui Naupli e Metanaupli di questo Crostaceo. Già in una ricerca iniziale (BARIGOZZI e FANTONI 1942) ci si era proposti di determinare se la colchicina produce un effetto di poliploidizzazione in *Artemia*, e abbiamo potuto concludere che, anche in dosi letali e con trattamento prolungato (gr. 0,0018%; gr. 0,0036%; gr. 0,0054%; per 14 e più, fino a 24 ore), non si riscontrano picnosi (viste in gran numero soprattutto da DUSTIN nei topi), ma numerose ricostituzioni nucleari, con conseguente poliploidia: consta inoltre che i nuclei — per effetto della colchicina — si ricostituiscano in una fase di riposo dopo la mitosi arrestata dall'alcaloide, come sarebbe indirettamente provato dall'aumento del numero dei nucleoli che — secondo la tesi di HERTZ (1932) — sono in numero fisso per ogni assetto cromosomico. Posso ora — con questi elementi — prevedere i seguenti possibili risultati, in relazione allo stato delle nostre conoscenze circa l'azione della colchicina sui cromosomi:

a) Se la colchicina agisce variando la quantità e il momento di formazione della matrice durante la mitosi, come sembra di dover ammettere in base alle osservazioni di SOKOLOV (1938) per *Chorthippus*, si dovrebbe osservare una variazione nella forma dei cromosomi durante la mitosi.

b) Se la colchicina ha una azione sulla visibilizzazione dei cromosomi indipendentemente dalla mitosi (RIES 1939) essa potrebbe manifestarsi nei numerosi nuclei (per es. del tessuto muscolare), che non sono sede di cariocinesi, ma sono di solito in riposo o raramente in endomitosi, o in quelli che sono distinti da un peculiare comportamento della matrice durante lo sviluppo del *Metanauplius*.

c) Infine potrebbe presentarsi la opportunità di uno studio della ricostituzione nucleare, cioè degli stadi di despiralizzazione dei cromosomi. Questo sarebbe interessante, poichè nel mio lavoro già ricordato, notavo che tanto sono chiari gli stadi di spiralizzazione profasica, altrettanto sono oscuri quelli di despiralizzazione telofasica, probabilmente per il fatto che la profase è lenta e la telofase è breve; d'altra parte, nel lavoro mio e di FANTONI si dimostra che i nuclei nei quali si è probabilmente indotto il poliploidismo hanno una struttura normale.

È opportuno prospettare fin d'ora quale sia l'andamento probabile dell'azione della colchicina sul *Nauplius* o sul *Metanauplius* trattati. Al momento nel quale viene iniziato il trattamento sperimentale, sono in corso numerose mitosi, nei loro vari stadi. La colchicina arresterà sicuramente il fuso di quelle cellule che si trovano in stadi nei quali esso è

già formato e inibirà del tutto la sua formazione nelle profasi precoci. Il risultato prevedibile di tutto ciò, sarà un aumento del numero delle forme di metafase anormale [denominata da LEVAN metafase c (1938)], caratterizzate dal passaggio ad una forma particolare di ricostituzione di tipo telofasico, con conseguente raddoppiamento dell'assetto cromosomico. Questo viene supposto in base alle osservazioni dei precedenti Autori, che, concordemente, hanno osservato un passaggio dalla prometafase alla telofase, senza l'interporsi dell'allontanamento dei cromatidi verso i poli (NEBEL e RUTTLE 1938; LEVAN 1938). Credo poi che non sia privo di interesse poter seguire passo passo la fine della mitosi colchicinizzata, perchè gli Autori che si sono occupati precedentemente di questo fenomeno hanno meno approfondito questa parte della loro analisi.

Inoltre è prevedibile che nuove mitosi comincino la loro profase precocissima già sotto l'azione della colchicina; su queste — che troveremo presumibilmente miste alle prime — si potrà controllare se i fenomeni di spiralizzazione e di formazione di matrice sono influenzati dall'alcaloide.

#### Metodo.

Dati gli scopi di questa ricerca mi è sembrato necessario sottoporre il materiale di esperimento a condizioni estreme, senza preoccupazione per la loro eventuale letalità, appunto per destare il massimo possibile di variazioni dalla norma. L'adoperare dosi mortali avrebbe potuto presentare un solo inconveniente: quello di provocare delle degenerazioni grossolane nei nuclei, che non avrebbero potuto permettere alcun opportuno riscontro con gli stadi normali. Siccome quasi in nessun caso ho riscontrato fatti di questo genere, devo pensare che le concentrazioni anche letali costituiscono un elemento di vantaggio per la ricerca.

Ecco come ho eseguito il trattamento colla colchicina:

Ho fatto sgusciare *Nauplii* di *Artemia* tetraploide partenogenetica di Portorose e li ho posti per 3, 14, o 24 ore in acqua di mare sintetica, preparata col solito metodo da me usato (BARIGOZZI 1939), alla quale erano state aggiunte le seguenti proporzioni di soluzione satura di colchicina: 1:50, 2:50, 3:50, pari alle seguenti percentuali in peso: gr. 0,0018%, gr. 0,0036%, gr. 0,0054%. Dopo 14 ore le *Artemie* erano già assai torpide nei movimenti, nè si riprendevano dopo essere state trasportate in acqua salata pura. Dopo 24 ore apparivano addirittura moribonde.

Analoga appare la resistenza dei *Metanauplius*, che furono sottoposti in diversi stadi ad un trattamento corrispondente.

L'esame citologico fu compiuto su circa 200 esemplari (oltre ai controlli), costantemente preparati per schiacciamento con carminio acetico (colorazione per 1 ora e un quarto), montati in euparal, e osservati con obb. imm.  $\frac{1}{15}$  semiapoc. e oc. 18 comp., con luce verde monocromatica.

#### Osservazioni.

a) sul *Nauplius*. Descriveremo ora le diverse forme osservate nei cromosomi, premettendo un breve riassunto della mitosi normale nel *Nauplius*

e nel *Metanauplius*. Nel primo, la profase si inizia con uno stadio nel quale i filamenti si despiralizzano, perdendo cioè in gran parte quella sottile e irregolare spiralizzazione che si può considerare caratteristica per il riposo nucleare. Successivamente compaiono le minute spirali profasiche, che danno al cromosoma un aspetto tipico (fig. 1). A queste segue il passaggio ad una seconda spiralizzazione a giri larghi (fig. 2), durante il quale il filamento si ispessisce, perchè si ricopre di matrice. Infine, un nuovo strato di matrice avvolge il tutto e il cromosoma diventa reniforme o a bastoncino breve

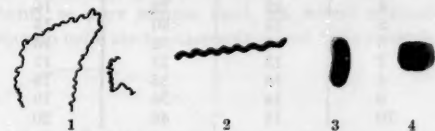


Fig. 1—4. 1 spirale profasica, 2 id. con spirali grandi, 3 prometafase, 4 metafase. (Ingr. circa 1750 volte.)

lievemente incurvato (fig. 3), per contrarsi, infine, ulteriormente, assumendo l'aspetto di un granulo (fig. 4). Quest'ultima figura corrisponde alla metafase. Questi stadi sono facili da distinguere, e si incontrano frequentemente in ogni preparato.

Se consideriamo i preparati trattati con colchicina — pure nel *Nauplius* — per tutte e tre le concentrazioni indicate, riscontriamo un gran numero di forme metafasiche, e di fasi successive che potremo denominare postmetafasiche, intendendo con questo nome tutti gli stadi di forte contrazione cromosomica e simili alla metafase normale susseguenti alla metafase, che non trovano riscontro nella mitosi normale, e sono caratteristici delle cariocinesi bloccate dalla colchicina<sup>1</sup>.

Distinguiamo la metafase dalla postmetafase per i seguenti caratteri: nella prima i cromosomi sono disposti regolarmente nella piastra equatoriale e sono di forma granulare. Nella seconda, i cromosomi mantengono la stessa forma, ma sono disposti in modo irregolare e variabile, formando come un piccolo mucchio (fig. 5); essi conservano intera la loro colorabilità. Questo stadio si distingue dalla prometafase (ove pure i cromosomi sono disposti in modo qualunque), perchè in questo caso essi sono notevolmente più allungati, assumendo l'aspetto di un brevissimo bastoncino.

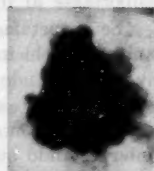


Fig. 5. Postmetafase da colchicina. (Ingr. circa 700 volte.)

Al fine di avere un'idea della frequenza delle mitosi, ho contato il numero di metafasi, anafasi e telofasi in 20 esemplari normali, e il numero di metafasi e postmetafasi in altrettanti esemplari trattati, trovando i numeri seguenti, che sono ordinati secondo valori crescenti:

<sup>1</sup> Con questa parola (postmetafase) intendo lo stadio che secondo Levan è denominato anafase c.

N. progressivo dell'animale	normali	trattati	N. progressivo dell'animale	normali	trattati
	metafasi + anafasi + telofasi	metafasi + postmetafasi		metafasi + anafasi + telofasi	metafasi + postmetafasi
1	4	16	11	15	56
2	5	22	12	18	56
3	7	24	13	18	59
4	12	29	14	18	60
5	13	30	15	21	67
6	13	32	16	21	73
7	13	32	17	23	75
8	14	35	18	24	76
9	14	36	19	36	80
10	14	46	20	38	98

I nuclei con cromosomi contratti negli individui trattati sono numerosissimi, e da ciò si può concludere che la colchicina arresta lo svolgimento della mitosi alla metafase; siccome la metafase diventa uno stadio terminale del fenomeno (prescindendo dalla ricostituzione nucleare) il numero delle mitosi arrestate aumenta, perdurando l'effetto dell'alcaloide. Questa constatazione non ha nulla di sorprendente, perchè corrisponde perfettamente a quanto ci si poteva attendere in base a precedenti ricerche. Però da questo fatto possiamo ricavare un criterio importante ai fini delle nostre osservazioni.

Se le metafasi e le postmetafasi sono in numero più elevato negli animali colchicinizzati, vuol dire che molte mitosi hanno cominciato a svolgersi quando la colchicina era già in azione. Perciò si possono prospettare due casi: 1) se i cromosomi di alcune di queste si presentano con caratteri normali, e quelli di alcune altre con caratteri anormali, interpretando queste ultime come svoltesi sotto l'influenza della colchicina, potremo inferire che la colchicina altera in qualche modo la struttura e la forma dei cromosomi, come gli Autori hanno affermato per altre specie; 2) se tutte le metafasi e postmetafasi sono uguali per l'aspetto dei loro cromosomi, concluderemo che l'azione dell'alcaloide non agisce sui processi che determinano la forma del cromosoma.

Ora, se esaminiamo attentamente la metafase e la postmetafase, constatiamo una assoluta costanza di forma dei cromosomi in ogni caso osservato, e concludiamo che, anche sotto l'influenza della colchicina, i cromosomi si rivestono di matrice e si contraggono come in condizioni normali. In altre parole, in *Artemia salina*, i cromosomi possono acquistare la loro forma definitiva normale della metafase, anche sotto l'influsso della colchicina.

Se ciò è vero, non è però ancora escluso che lo stesso stadio finale possa essere raggiunto attraverso differenti serie di stadi intermedi. Perciò ho esaminato tutte le forme di profase e di prometafase, per accertare se la mitosi colchicinica si inizi e prosegua fino al suo stadio culminante senza deviare dalla norma.

La fase iniziale di despiralizzazione si osserva assai raramente, come avviene anche nei preparati normali, e solo si nota che i filamenti sono un po' più spessi, come se vi fosse una precoce formazione di matrice. Più frequente è invece lo stadio di spirale profasica (fig. 6), che sembra differenziarsi dalla norma anche per una certa deposizione di matrice, che rende poco visibili le piccole spirali; siccome però vi è una ragguardevole differenza da caso a caso, non presento questa osservazione come sicura.

Differenze meno incostanti, se pure sempre lievi, tra mitosi normali e mitosi con colchicina si trovano nello stadio successivo, cioè della seconda

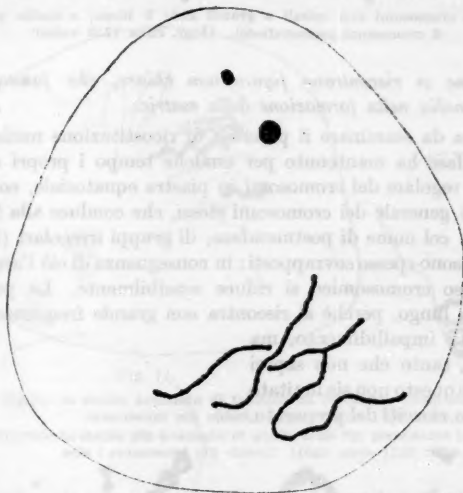


Fig. 6. Nucleo con spirali profasiche (trattato con colchicina): sono stati disegnati solo quattro cromosomi e i nucleoli. (Ingr. circa 1750 volte.)

spiralizzazione a giri larghi. Non si può veramente dire neppure qui che il processo decorra in modo radicalmente diverso dalla norma; soltanto, nei preparati di Artemie colchicinizzate, le fasi di spiralizzazione si osservano male. I giri del cromonema sono poco evidenti, e tutto il cromosoma è poco chiaro, come dimostra la fig. 7. L'impressione che si ricava è che la spiralizzazione avvenga regolarmente, ma sia mascherata in modo abnorme dalla matrice. Non si può neppure dire che questa sia particolarmente abbondante o molto colorata, perchè si tratta anzi di figure pallide. Si può forse esprimere meglio il loro aspetto, definendole come dotate di scarsa *fissabilità*; termine questo, di significato poco preciso, ma usato generalmente dai Citologi per indicare quelle immagini poco chiare che non sembrano dovute a imperfezione di tecnica. Invece lo stadio di prometafase è del tutto corrispondente alla

norma (fig. 8). *In conclusione, la mitosi decorre con caratteri di normalità sotto l'influsso della colchicina fino alla metafase. Solo negli stadi di grande*



Fig. 7 a—d. a cromosomi con spirali a grandi giri; b idem; c stadio più avanzato; d cromosomi prometafasici. (Ingr. circa 1750 volte)

*spiralizzazione si riscontrano figure non chiare, che fanno sospettare qualche anomalia nella formazione della matrice.*

Resta ora da esaminare il processo di ricostituzione nucleare. Dopo che la metafase ha mantenuto per qualche tempo i propri caratteri di disposizione regolare dei cromosomi in piastra equatoriale, comincia uno spostamento generale dei cromosomi stessi, che conduce alla formazione, già descritta col nome di postmetafase, di gruppi irregolari (fig. 5) dove i cromosomi sono spesso sovrapposti: in conseguenza di ciò l'area occupata dal complesso cromosomico si riduce sensibilmente. La postmetafase dura certo a lungo, perchè si riscontra con grande frequenza. Qualche volta si nota impallidimento, ma non sempre, tanto che non saprei escludere che questo non sia limitato ai punti poco riusciti del preparato.



Fig. 8.

Fig. 9.



Fig. 10.

Fig. 8. Prometafase (colchicina). (Ingr. circa 1750 volte.)

Fig. 9. Metafase che ha risentito dell'effetto della colchicina. (Ingr. circa 1750 volte.)

Fig. 10. Due cromosomi in telofase (despiralizzazione) da colchicina. (Ingr. circa 1750 volte.)

La postmetafase assume poi un aspetto tipico, interpretabile come una parziale fusione dei cromosomi, specialmente nelle loro estremità. Si potrebbe quasi parlare di un incatenamento dei cromosomi, però molto irregolare (fig. 9); ritengo però che si tratti di un contatto estremamente superficiale, dovuto essenzialmente alla matrice. In questo momento ha luogo la despiralizzazione dei cromosomi, che deve avvenire rapidamente, forse di scatto, data la rarità degli stadi osservati. Tuttavia è probabile che alcuni nuclei degenerino, anche se — in realtà — non ho notato vere figure di smembramento e di dissolvimento. Nella fig. 10 si vedono

due cromosomi, che hanno già largamente allontanate le spire; è degno di nota il fatto che, dopo essere scomparso lo strato di matrice che riveste il cromosoma (la matrice del cromosoma, secondo KUWADA 1939) e ne nasconde la struttura spiralata, compare il cromatidio a spirale, che appare pure rivestito di un proprio strato di matrice (la matrice del cromatidio, sempre sec. KUWADA), dato che lo spessore di questo è assai maggiore di quello caratteristico dello stadio di riposo. Nella fig. 11 è rappresentato uno stadio più avanzato, con despiralizzazione più cospicua, e con matrice propria dei cromonemi in disfaccimento. Merita di essere considerato



Fig. 11.

Fig. 11. Nucleo in stadio avanzato di telofase da colchicina (sono stati disegnati solo i cromosomi più chiari.) (Ingr. circa 1750 volte.)



Fig. 12.

Fig. 12. Telofase in stadio più avanzato di quella della fig. precedente (sono stati disegnati solo i cromosomi più chiari). (Ingr. circa 1750 volte.)

in particolare il cromosoma in alto, che è manifestamente doppio, come deve essere in una fase finale di mitosi bloccata. Ancora non va trascurato l'orientamento parallelo dei cromosomi, che somiglia a quello descritto da DARLINGTON (1935) in *Fritillaria*. Questo aspetto è pure evidente nella fig. 12, che corrisponde ad una telofase, con quasi completo disfaccimento della matrice. Questo orientamento fu riscontrato in pochissimi casi: si tratta di un fenomeno incostante, o di uno stadio fugacissimo. Nella fig. 16 ormai la telofase è passata nel riposo, tanto che è cominciata la formazione dei nucleoli. Successivamente deve andare perduta ogni traccia di orientamento parallelo, anche dove vi era. Infatti negli stadi in riposo di nuclei poliploidi, cioè di quei nuclei nei quali ha avuto luogo un fenomeno di ricostituzione del tipo descritto, i cromonemi sono a fini spirallature irregolari, disposti però con la più variabile sinuosità. Nella fig. 13 si vede poi un aspetto insolito (di cromosomi semi disfatti, ma non despiralizzati), che non è facilmente interpretabile. Non escludo che si tratti di una forma di degenerazione.

Le serie di figure riprodotte rappresenta la conclusione della mitosi bloccata dalla colchicina, e — per le ragioni espresse prima — vale tanto per le cariocinesi colte dall'azione dell'alcaloide già a stadi di profase avanzata, quanto per quelle che già al loro nascere si sono trovate in ambiente colchicinizzato.

Accanto a queste forme di mitosi aberrante, troviamo nei *Naupli* alcune *endomitosi* vere e proprie, che hanno luogo anche normalmente, specialmente negli esemplari già un pò sviluppati. I caratteri presentati da questo fenomeno corrispondono in tutto a quelli già descritti per il *Nauplius* normale (BARIGOZZI 1942). Qui basterà ricordare i caratteri che più differenziano l'endomitosi dalla mitosi arrestata. La prima non



Fig. 13.



Fig. 14.

Fig. 13. Riposo di nucleo ricostitutosi dopo l'effetto della colchicina (sono rappresentati solo i cromosomi più chiari e i nucleoli). (Ingr. circa 1750 volte.)

Fig. 14. Cromosomi in stadio incerto. (Ingr. circa 1750 volte.)

giunge mai ad una forma di cromosoma a granulo; anche lo stadio di massima contrazione ha forma di bastoncino, fortemente ispessito dalla matrice (fig. 15). Non si osservano costantemente spirali; ma è probabile che vi siano le spirali profasiche, dato un indubbio accorciamento del cromosoma endometafasico in confronto col cromonema del riposo nucleare o della endoprofase molto precoce.

Le osservazioni compiute (cfr. fig. 15 con fig. 16) ci fanno ritenere che la colchicina non influisce sull'endomitosi, la quale mantiene una fisionomia propria rispetto alla mitosi bloccata.

Non furono mai osservate mitosi bloccate con numero cromosomico superiore a 84.

L'ultimo punto da esaminare è quello dello stato dei cromosomi nelle cellule giganti (poliploidi) del tessuto muscolare, che si accrescono solo per endomitosi, e sono normalmente in riposo. In queste cellule l'azione sulle strutture cromatiche dovrebbe essere evidente, se ci fosse. Ho osservato con cura il loro aspetto, date le osservazioni di RIES (1939) già

ricordate sulla *Periplaneta*. Il risultato della mia indagine è negativo: l'aspetto è identico a quello degli individui non trattati, perciò sembra che in *Artemia* non vi sia alcuna reazione da parte dei nuclei in riposo nei confronti della colchicina.

b) Sul *Metanauplius*. Ho esteso le mie indagini al *Metanauplius I*, *II*, *III* e *IV* per constatare non tanto eventuali variazioni negli aspetti cromosomici della mitosi, quanto eventuali variazioni nell'aspetto dei cromonemi dei nuclei in riposo. Infatti nel mio lavoro già citato ho descritto dei cambiamenti di spessore e di colorabilità nei cromonemi, che nel *Metanauplius I* sono più grossi, che nel *Nauplius*; nel *Metanauplius II* non variano, nel *Metanauplius III* sono singolarmente pallidi, e nel *Metanauplius IV* sono più spessi e più colorabili che in ogni stadio pre-



Fig. 15.

Fig. 15. Endometafase in *Nauplius* normale. (Ingr. circa 1750 volte.)

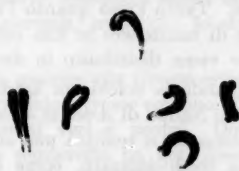


Fig. 16.

Fig. 16. Endometafase in *Nauplius* colchicizzato. (Ingr. circa 1750 volte.)

cedente, tranne che nelle cellule dell'epitelio intestinale, dove l'ispessimento è minore.

Tutte queste trasformazioni sono perfettamente osservabili anche negli animali trattati, onde dobbiamo riconoscere che anche questi aspetti delle trasformazioni cromosomiche non sono influenzati dalla colchicina.

#### Discussione.

Le osservazioni compiute consentono di portare un contributo alla conoscenza dei fenomeni cromosomici non solo in relazione all'influenza della colchicina, ma anche alla mitosi normale.

I fenomeni di *Artemia* permettono di attribuire ai cromosomi una grandissima stabilità di fronte all'azione della colchicina, perchè nè la spiralizzazione, nè la contrazione, nè la formazione della matrice vera e propria appaiono seriamente modificate dall'alcaloide, tranne che per l'aspetto della matrice al momento della spiralizzazione.

È doveroso riconoscere però che la piccolezza dei cromosomi non permette di osservare con molta precisione la regione del centromero, onde non posso escludere l'esistenza (senza che essa venga rilevata) di qualche modificazione del tipo di quella osservata da SOKOLOV (1938) nella

costrizione primaria (formazione di un ponte sottile). La brevità delle braccia cromosomiche nella profase inoltrata e nella prometafase non concede neppure che si realizzino quelle variazioni dell'angolo tra le braccia stesse, che furono viste pure da SOKOLOV (1938), e analogamente si dica per le osservazioni di O'MARA, perchè in *Artemia* non si vedono avviticchiamenti metafasici. Comunque è da escludere l'azione „cromosomotropa“ osservata da RIES (1939) in *Periplaneta*.

Le osservazioni di quest'ultimo Autore meritano di essere controllate su altro materiale, per poter concludere se la visibilizzazione dei cromosomi nei nuclei in riposo sia un fatto generale, largamente diffuso, che manca eccezionalmente in *Artemia*, oppure sporadico o addirittura limitato a *Periplaneta*.

Dobbiamo ora considerare la questione degli aspetti caratteristici, rispettivamente per la mitosi arrestata dalla colchicina e per la endomitosi. Tanto l'uno quanto l'altro fenomeno hanno in comune l'effetto finale di mantenere in una cellula sola il complesso genico che normalmente viene distribuito in due cellule.

Quando la colchicina agisce a lungo su un organismo — come è il caso dei Naupli di *Artemia* — senza impedire lo svolgimento dei fenomeni cromosomici, si realizza una completa evoluzione dei cromosomi in ambiente colchicinizzato, come è dimostrato dal ritrovamento di forme profasiche e prometafasiche dopo molte ore di trattamento in colchicina. In questo caso la colchicina non ha certamente permesso neppure la formazione di un principio del fuso, date la sua sicura azione sulla figura acromatica, dunque le condizioni della mitosi colchicinizzata (mitosi c, secondo LEVAN 1939) sono apparentemente identiche a quelle della endomitosi. Eppure ho constatato che l'endomitosi è caratterizzata da forme di cromosomi che, nella mitosi bloccata, non si riscontrano mai; perciò posso escludere che l'endomitosi possa confondersi colla mitosi bloccata.

Se confronto i cromosomi metafasici con quelli endometafasici [e i più recenti dati di GEITLER su *Gerris* (1941) collimano pienamente coi miei] trovo che l'endomitosi presenta spiralizzazione e contrazione minori o scarse o nulle. Analizzando le diverse teorie sulla spiralizzazione nel mio lavoro già citato, avevo avanzato l'ipotesi che fossero quelle condizioni generali della cellula che determinano la presenza del fuso, a indurre l'intensa spiralizzazione tipica della mitosi. Le osservazioni colla colchicina permettono di rilevare la stessa differenza di forma tra i cromosomi, anche quando, per una causa indotta sperimentalmente (colchicina), il fuso non si forma, oppure quando esso non c'è naturalmente mai. Vi sono dunque delle cellule che, quando per la loro posizione nel *Nauplius* diventano, per es., elementi muscolari o nervosi, vengono a essere sedi di endomitosi, con il conseguente grado caratteristico di spiralizzazione e

contrazione; invece quelle cellule che sono normalmente sede di mitosi, anche se vengono a trovarsi in condizioni tali da avvicinarsi molto a quelle di una endomitosi, mantengono i propri cromosomi mitotici tipici.

Con queste ultime argomentazioni siamo già usciti dai limiti dello studio dell'azione della colchicina, per entrare in considerazioni di interesse più generale: questo significato ha appunto l'ultima questione alla quale credo opportuno dedicare qualche attenzione. Osservando i preparati normali di *Artemia*, avevo notato che l'anafase e la telofase si svolgono in modo da non permettere di riconoscere le modalità precise con le quali esse hanno luogo. Coll'azione della colchicina, invece, si ottiene una maggiore lentezza nel susseguirsi delle fasi di ricostituzione, da permettere un'osservazione più facile. Naturalmente non è possibile interpretare queste figure prodottesi in condizioni sperimentali come del tutto corrispondenti a quelle normali: tuttavia, siccome i nuclei che si ricostituiscono non differiscono da quelli normali, credo che lo studio non sia privo di interesse.

I due fatti salienti osservati sono: a) la matrice che riveste esteriormente il cromosoma dandogli l'aspetto di granulo, riveste con uno strato particolarmente aderente anche i cromonemi veri e propri. Questo risulta bene dalla fig. 11, dove la spirale semisvolta ha uno spessore tale da non essere spiegabile se non ammettendo un rivestimento proprio di matrice. Ora — a proposito del processo inverso di spiralizzazione — io avevo appunto osservato (1942) che una prima deposizione di matrice ha luogo sul cromonema appena all'inizio della spiralizzazione, e che altra matrice si deposita poi in modo da rivestire esteriormente il cromonema spiralizzato, senza voler affermare che esistano due strati veri e propri di matrice distinti. Nella despiralizzazione conseguente all'azione della colchicina si osserva precisamente il rovescio, e cioè: prima un dissolvimento della matrice superficiale, poi un rallentarsi delle spire, e infine un dissolversi della matrice più aderente al cromonema. Questo modo di procedere del fenomeno corrisponde fin qui alle vedute di DARLINGTON (1937), il quale afferma: (*the chromosomes*) . . . *form a compact mass, which passes through stages in some aspects comparable with the reverse processes of prophase* (pag. 30), e di WHITE (1937) che si esprime press'a poco nello stesso modo. Dopo che i cromonemi si sono parzialmente despiralizzati va perduta anche la matrice aderente ai cromonemi; però successivamente — cioè nello stadio di riposo — si nota un rimaneggiamento dell'aspetto dei cromonemi stessi, che diventano tosto sinuosi e a spiralture minute e irregolari. Posso dunque affermare che, nelle ricostituzioni nucleari di *Artemia salina* per effetto della colchicina, nel nucleo in riposo non si trovano semplicemente dei cromonemi despiralizzati, con giri allentati e irregolari, corrispondenti a quelli della telofase. Siccome DARLINGTON

(1937) ritiene che non avvengano altre profonde variazioni dopo la telofase, variazioni che subentrerebbero solo alla profase precoce successiva (osservazioni compiute su *Fritillaria*), con un'alteriore trasformazione delle spirali, devo riconoscere che i fenomeni ora descritti non si accordano collo schema di DARLINGTON dello stadio di riposo.

Dopo l'arresto della metafase operato dalla colchicina, ha luogo dunque una despiralizzazione, alla quale segue una formazione di spirali piccole e irregolari. Indipendentemente dall'azione dell'alcaloide si osserva però sempre che queste spirali, così facilmente visibili nello stadio di riposo delle cellule del *Nauplius*, sono molto caratteristiche, e ci si può chiedere in quale relazione stiano colle spiralizzazioni profasiche e colla despiralizzazione telofasica. È noto che a questo proposito è sorta una complessa questione, di fronte alla quale gli AA. non sono d'accordo. Secondo DARLINGTON e UPCOTT (1939) nella mitosi si può supporre una spirale a giri ampi, costituita a sua volta da una spirale più piccola; STRAUB (1939), dopo un'ampia revisione della letteratura, crede invece che questo aspetto di solito si osservi solo nella meiosi, e non nelle mitosi somatiche. Questo Autore dubita perfino della piccola spirale nella meiosi. Invece KUWADA (1939) ritiene che nella metafase il cromosoma sia formato da una doppia spirale. È necessario tenere presente queste tre affermazioni [due che si accordano (DARLINGTON e UPCOTT, KUWADA) e una è in disaccordo (STRAUB)] perchè in *Artemia salina* i cromosomi sono troppo piccoli per poter escludere in modo certo l'uno o l'altro schema. È sicuro che nella profase si nota solo una spirale a giri larghi, e non si riesce a vedere che questa consti di una spiralizzazione più minuta. Anche le dimensioni dei cromosomi spiralizzati, confrontati con la lunghezza dei cromosomi despiralizzati della profase precoce, non inducono a pensare a una spirale doppia. Però non sono in grado di escludere che la spirale sembri semplice solo perchè è troppo piccola. Ammettendo dunque di non poter dirimere la questione, restano aperte due possibilità, per spiegare le spirali del nucleo in riposo:

a) Se vi è una doppia spirale nella profase tardiva e nella metafase, le spirali dello stadio di riposo risulterebbero dall'aprirsi e dallo svolgersi delle spirali minori della metafase precedente (seguendo il concetto primitivamente espresso da DARLINGTON).

b) Se non vi è una doppia spirale nelle fasi dette sopra, bisogna pensare che nello stadio di riposo abbia luogo una nuova spiralizzazione, a giri più numerosi, e forse anche più numerosi di quelli della profase tardiva, più rilasciati e irregolari di quelli della profase precoce (spirale profasica).

#### Conclusioni.

1. La colchicina (in concentrazioni letali per il *Nauplius* e il *Meta-nauplius* di *Artemia salina* LEACH.) altera il fuso come in altri casi studiati,

e i nuclei si ricostituiscono con assetto cromosomico doppio, senza che si riscontrino vere e proprie alterazioni delle strutture cromosomiche.

2. I vari aspetti caratteristici dei cromosomi somatici di *Artemia salina* (legati con le mitosi o indipendenti da essa) non risentono alcuna influenza della colchicina.

#### Lavori citati.

- Barigozzi, C.: Atti Soc. ital. Sci. nat. 78, 137 (1939). — Boll. Soc. Biol. sper. 16, 720 (1941). — Chromosoma 2, 251 (1942). — Barigozzi, C. e L. Fantoni: Monit. zool. ital. 53, 69 (1942). — Buchner, O.: Z. Zellforsch. 20, 283 (1939). — Darlington, C. D.: Proc. roy. Soc. Lond. B. 118, 33 (1935). — Recent advances in Cytology. London 1937. — Darlington, C. D. and N. B. Upcott: Chromosoma 1, 23 (1939). — Dustin, A. P.: Arch. exper. Zellforsch. 22 (1938). — Gavaudan, P.: C. r. Soc. Biol. Paris 129, 559 (1938). — Gavaudan, P. et N.: C. r. Soc. Biol. Paris 128, 717 (1938). — Geitler, L. v.: Erg. Biol. 18, 1 (1941). — Heitz, E.: Planta 12, 774 (1931). — Kuwada, J.: Cytologia 10, 213 (1939). — Levan, A.: Hereditas (Lund) 24, 471 (1938); 25, 9 (1939). — Nebel, B. R. and M. Ruttle: J. Hered. 29 (1938) (estratto). — Riez, E.: Naturwiss. 27, 505 (1939). — Sokolov, J.: C. r. Acad. Sci. URSS. 25, 298 (1939). — Straub, J.: Z. Bot. 33, 65 (1939).

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Abteilung F. v. WETTSTEIN.)

## CYTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN ANTIRRHINUM MAJUS MUT. CANCROIDEA.

### ENDOMITOTEN-ENTWICKLUNG.

Von

EMMY STEIN, Berlin-Dahlem.

Mit 20 Textabbildungen (in 57 Einzelbildern).

(Eingegangen am 8. April 1942.)

#### Einleitung.

Vor einigen Jahren (1936 b) habe ich von der Norm abweichende Mitosen beschrieben, die in der durch Radiumbestrahlung erzeugten Mutante *cancroidea* von *Antirrhinum majus* in großer Zahl auftraten. Die paarweise Anordnung der Chromosomen in der Prophase, in der sie ohne Berührung auch der Spindelansatzstellen, oft vollständig voneinander getrennt sind (1936 b, Abb. 8 III, IV) und das dichtere Aneinanderdrücken in der Metaphase zu regelmäßigen Doppelbildungen (Abb. 8 VI, VII, VIII; Abb. 9 II, IV u. V) ließen damals vermuten, daß es sich um eine Annäherung zweier Chromosomen handle. Zählungen von Meta- und Anaphase-Chromosomen führten in diesem Zusammenhang zu dem Schluß, daß eine Reduktion der vorher im Soma auf andere Weise entwickelten polyploiden Zahlen vorliegen müsse. Wenn nämlich die Metaphase aus 16 Doppelchromosomen bestand, so waren in jeder Anaphasenplatte 16 Teilhälften dieser Doppelchromosomen zu beobachten; 1936 b Abb. X.

Innere Kernteilungen waren in jener Zeit zwar postuliert, aber noch nicht bekannt. Erst die Arbeiten von GEITLER an Wanzen (1938/1939), die die Chromosomenzahlen im Ruhekern durch das Sichtbarbleiben der Geschlechtschromosomen aufklären konnten, legten den Grund für neue Entdeckungen und Vorstellungen, die seitdem durch GEITLER und seine Schule, aber auch anderweitig weiter entwickelt sind. Es handelt sich um die Beweisführung für eine Vermehrung der Chromosomensubstanz und die Verdoppelung der Chromosomenzahl außerhalb des Vorganges der Mitose.

Die für Pflanzen bekannten Erscheinungen der Polysomatie (Lit. bei GEITLER 1941, S. 20) sind heute auf der Grundlage dieser endomitotischen Vorgänge weitgehend geklärt, und die Paarung somatischer Metaphase-Chromosomen in polyploiden Zellen gilt bereits als Kriterium für eine Entstehung der Paare durch innere Teilung und für die Verdoppelung der Chromosomenzahl auf diesem Wege (GEITLER 1941, S. 21).

Der unmittelbare Nachweis der Endomitose ist bei Pflanzen nicht immer möglich, jedoch ist ihre Tatsache mehrfach sichergestellt. In

*Sauromatum guttatum* und *Trianea bogotensis* erwies GEITLER (1938b) echtes Kernwachstum durch Chromatin-Vermehrung. Untersuchungen von INA GRAFL (1939/1940) konnten für die großen Kerne von *Sauromatum* zeigen, daß je nach der endomitotisch erreichten Valenzstufe in den Prophasen künstlich ausgelöster Teilungen Chromosomengruppen auftreten, die aber in der Metaphase bereits getrennt sind.

Die endomitotische Entstehung der polyploiden Kerne im Perilem von Spinatwurzeln ist durch GENTCHEFF und GUSTAFSSON zunächst statistisch bewiesen (1939); auf ihre cytologischen Ergebnisse kommen wir noch zurück. Die weiteren einschlägigen Arbeiten sind im Sammelreferat von GEITLER (1941) eingehend besprochen. Seitdem hat HAIG DERMEN (1941) an den Internodien von Bohnen durch Naphtalinessigsäure-Lanolinpaste Tumoren erzeugt und Erscheinungen der Polyploidisierung durch Endomitose beobachtet.

Auf Grund dieser Tatsachen wäre eine Nachprüfung meiner Befunde von 1936 schon 2 Jahre später wünschenswert gewesen, obwohl es sich auf Grund der Zählungen (s. oben) um eine Polyploidisierung nicht handeln konnte. Mit den bisherigen cytologischen Methoden war aber eine bessere Aufklärung nicht zu erhoffen, und zu statistischer Bearbeitung besteht, wie wir sehen werden, keine Möglichkeit (S. 316).

Erst die durch ERNST (1939) für *Antirrhinum* verbesserte Quetschmethode von HEITZ (1926), durch die sogar das Pachytän analytisch zugänglich wurde (ERNST 1939a, b), ließ eine gründlichere Durchdringung des Materials, vor allem der früheren Prophasen, erhoffen<sup>1</sup>.

Neuerdings nimmt GEITLER selbst (1941, S. 33) auf Grund seiner seitherigen Erfahrungen Stellung zu meinen Angaben. Er vermutet, daß die Deutung einer Reduktion irrig sei, und daß in Wirklichkeit Polyploidisierung durch innere Teilung vorliege. Diese Schlußfolgerung bleibt noch zu erörtern. (Vgl. S. 317.)

#### Methode und Material.

Der früheren Untersuchung lagen Schnittpräparate mit HEIDENHAIN-Färbung zugrunde, jetzt wurden Quetschpräparate nach ERNST (s. oben) angefertigt (Fixierung in gleichteiliger Mischung von Eisenkarmin-Essigsäure und CARNOY). Anfangs wurde nur mit Frischpräparaten gearbeitet, die später auf Rat von Dr. RESENDE konserviert wurden (unveröff.). Die fertigen Quetschpräparate werden bis zum Abrutschen der Deckgläser in 94%igen Alkohol gestellt und dann mit Euparal eingedeckt. Ein kleiner Teil des Quetschgewebes kann dabei verloren

<sup>1</sup> Wenn trotzdem die Wiederaufnahme erst jetzt erfolgen konnte, so lag das zunächst an anderen Aufgaben, dann aber an einer langen Arbeitsunterbrechung. Ich danke an dieser Stelle Herrn Prof. VON WERTSTEIN für sein freundliches Interesse an der Arbeit und dafür, daß er mir an seinem Institut die Möglichkeit zu ihrer Ausführung gab.

gehen. Bleibt er am Deckglas haften, so wird er leicht mit diesem auf einem zweiten Objektträger aufgefangen. Für das somatische Gewebe bewährt sich diese Konservierung meist recht gut. Nicht anwendbar ist sie für das junge Archespor und die Meiosis. Die E.K.-Methode an sich ist, wie schon die Pachytänanalyse von ERNST beweist, für die meisten meiotischen Phasen bei *Antirrhinum* gut anwendbar. Sie ist es auch für Untersuchungen des Somas, aber sie ergibt bei *Antirrhinum* keine different gute Färbung des prämeiotischen Archespons.

Das am 28. 2. 41 ausgesäte Material entstammte 11 verschiedenen *canc*-Pflanzen aus der Ernte 1938. Die Gewebsentartungen, es sind die der Gruppe B, sind 1935 (b) beschrieben.

Die Mutation mendelt rezessiv, ihren Auswirkungen liegt demnach eine Veränderung in einem sehr kleinen, fest umschriebenen Chromosomenbezirk zugrunde. Die  $\frac{canc}{canc}$  Pflanzen sind äußerlich kurz gedrungen, der Haupttrieb ist immer stark geschwollen und platzt oft auf infolge von Gewebsspannungen, die durch die regellose Entwicklung riesiger Zellen im Innern entstehen (Abb. 1). Eine Ähnlichkeit mit den seither häufig beschriebenen Colchicinschwellungen ist äußerlich und betrifft nicht die cytologisch wesentlichen Vorgänge (vgl. S. 331). Fast immer ist der Haupttrieb stark gekrümmt, und nicht selten führt diese Krümmung zu einer vollen Kreisdringung nach unten und wieder nach oben. Blätter



Abb. 1. Entblätterte Haupttriebe: a) cancroidea, b) normale Pflanze.

und Blüten sind meist breiter und größer als normal, dabei variabel in der Form, die Laubblätter können zudem stark verdickt sein. Die später entstehenden Nebentriebe sehen viel normaler aus, die Entartungsvorgänge im Innern sind hier weniger extrem, obwohl niemals ein Vegetationskegel von Nebentrieben ohne abnorme Zellbildungen gefunden wurde.

### Befunde.

#### a) Die Entartung der Gewebe und die durch sie bewirkte Polyploidisierung.

Die veränderten Kernteilungen waren 1934 und 1935 ausschließlich in der Blütenregion aufgetreten. Sie erreichten ihren Höhepunkt in großer Massenhaftigkeit und Regelmäßigkeit im prämeiotischen Arche-

spor. Mit zeitlicher und räumlicher Entfernung von dieser Phase und diesem Ort nahmen sie an Häufigkeit ab (1936b, S. 273).

In den Blütenknospen sind die veränderten Teilungen in diesem Jahr fast ganz ausgeblieben. Es ist möglich, daß ein Witterungsumschlag, eine vor der Blütenbildung einsetzende Kälteperiode, die Ursache dafür ist. Die Fixierungen von 1934 und 1935 waren laut Protokoll jedesmal bei großer Hitze gemacht. Die später sich entwickelnden Blütenknospen der normaler aussehenden Seitentriebe wurden zu der damaligen Untersuchung nicht benutzt, und es bleibt offen, ob in ihnen die veränderten Teilungen überhaupt nicht vorkommen. Jedenfalls scheinen die Vorgänge von den Außenbedingungen weitgehend abhängig zu sein. Dafür geben auch Befunde in den Pflanzen einer Herbstaussaat (2. 8. 41) einen Hinweis. Nur in solchen Pflanzen, die eine Zusatzbelichtung bekamen und außerdem warm standen, fanden sich formveränderte und gepaarte Chromosomen, in den unbehandelten waren nur die Gewebe in der bekannten Weise entartet ohne Gestaltswechsel der Chromosomen selbst.

Der Ausfall der erwarteten Teilungsvorgänge in der Blütenknospe stellte die Möglichkeit zu einem gültigen Ergebnis der Nachuntersuchung zunächst in Frage. Glücklicherweise war aber das Soma der heranwachsenden Pflanzen laufend fixiert und einer cytologischen Kontrolle unterzogen, und unmittelbar vor dem Einsetzen der Kälteperiode, von der die Phase der Blütenanlage betroffen wurde, waren zahlreiche Sproßspitzen eingelegt worden. In diesem und im vorgenannten Material wurden cytologische Veränderungen bis zur Blütenanlage beobachtet. Die Metaphasen zeigen eine allmähliche Umwandlung, und gerade das Erfassen dieser Entwicklung ermöglicht es, den vorliegenden Fall auf neuer Grundlage einigermaßen zu klären.

Formänderungen der Chromosomen wurden hauptsächlich, aber nicht ausschließlich in Partien unmittelbar unter dem Vegetationskegel beobachtet, also im obersten Teil des entstehenden Sproßgebietes und hier vorwiegend in dem Inneren, zum Markgewebe werdenden Corpus-Anteil, in dem auch die extremsten Gewebsentartungen vorkommen (E.S. 1935b, Abb. 3, 4; 1936b, Abb. 3). Hier erreichen die veränderten Mitosen ihre weitestgehende Entwicklung, eben bevor im V.K. das Vorwölben der Blütenanlagen beginnt. Von einer Häufigkeit veränderter Metaphasen, wie sie 1934 und 1935 in den jungen Antheren vorlagen, kann freilich keine Rede sein. Der Gestaltwechsel findet also nicht ausschließlich „in den Organanlagen der Blüte“ statt, sondern er kann eine allmähliche Entwicklung unmittelbar unter dem V.K. haben, der vor seiner Umwandlung in dem Blühesproß steht. Vermutlich ist aber auch diese Entwicklung von Außenbedingungen abhängig.

Die Entartung der Gewebe und die Polyploidisierung der Kerne ist längst im Gange, bevor die oben angedeutete Chromosomenveränderung einsetzt. Diese Tatsache soll näher begründet werden.

Die Zygoten der cane Pflanzen entstehen aus normal reduzierten Keimzellen und die jungen Pflänzchen in ihrer ersten Lebensphase

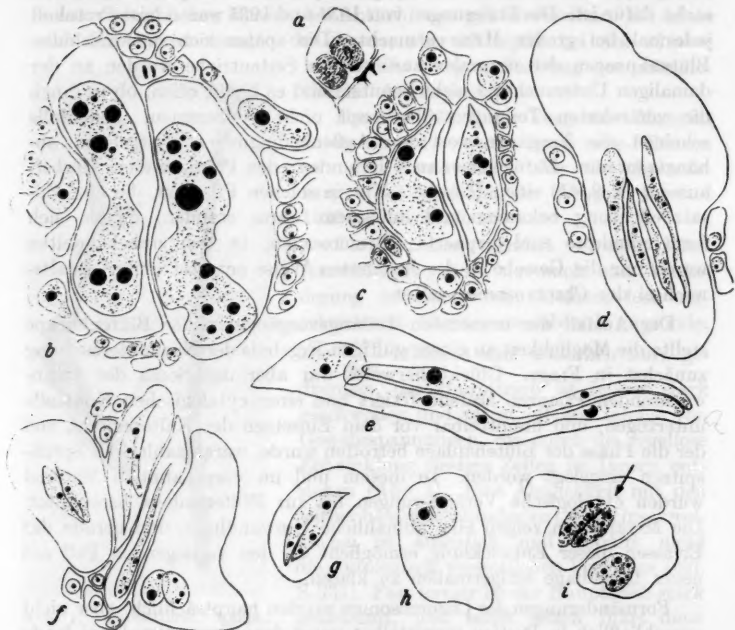


Abb. 2. a Telophase, 2 Kerne in einer Zelle, die Zellwandbildung ist unterblieben. b u. c Riesige Zellen mit großen deformierten Kernen. Außen weniger extrem veränderte, und normal diploide Zellen. d 4 gestreckte Kerne in einer Riesenzelle. e 3 Kerne verschiedener Gestalt in einer Zelle. f Rechts und links je eine große Zelle mit 2 Kernen. In der Mitte ein Kern, dessen Durchschnürung unvollendet ist. Im durchgeschnürten Abschnitt sind die Nukleolen geteilt und liegen symmetrisch auf jeder Seite. Im zusammenhängenden Abschnitt liegt ungeteilt ein größerer Nukleolus. Ähnlich der Kern g. h Ein zum Teil durchgeschnürter Kern mit den geteilten Nukleolen auf jeder Seite. i Die Nukleolen des Kerns  $\checkmark$  sind geteilt, aber die Kernwand ist nicht voll ausgebildet. Vergr. etwa 500.

sind diploid. Von 18 Keimlingen, die 10 und 14 Tage nach der Aussaat fixiert wurden, besaßen nur zwei vereinzelte tetraploide Kerne. In allen übrigen, und zwar sowohl in der Keimwurzel als im V.K. war die Chromosomenzahl normal ( $2n = 16$ ). Auffallend sind zunächst nur Telophasen, die keine Spur einer Zellwandbildung erkennen lassen (Abb. 2a). Durch Ausfall der Zellwandbildung kommt es zur Verschmelzung der Kerne, die dadurch zuerst tetraploid dann octoploid

werden. Weitere Störungen wurden erst zwischen dem 20. und 40. Tag nach der Aussaat gefunden. In diesem Zeitabschnitt sieht man bereits regellos verteilte Gruppen riesiger Zellen, die wie Fremdkörper im Gewebe liegen, mit großen, oftmals gelappten Kernen (Abb. 2b, c). Die Nucleolen wechseln an Zahl und Größe, und allein ihr Durchmesser kann ein mehr als Zehnfacher des Normalen sein. Die Folgen unterbliebener oder nur unvollständig durchgeführter Kern- und Zellteilungen sind in der Ruhephase oftmals zu erkennen. Zwei und mehr Kerne liegen häufig in einem Raum. Abb. 2d zeigt 4 spindelförmige Kerne in einer Zelle, Abb. 2e drei Kerne, von denen zwei lang und spindelförmig sind, der

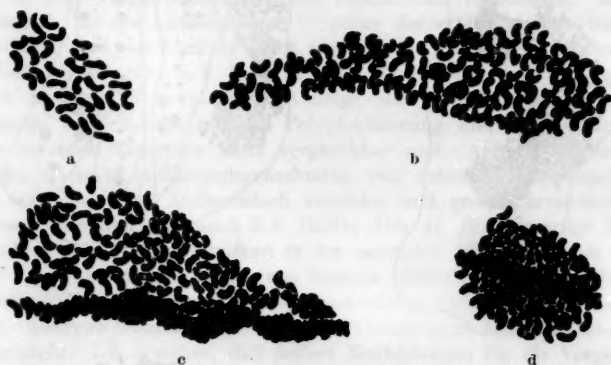


Abb. 3. Polypleide Metaphasen, die Chromosomen haben normale Gestalt. a Tetraploid, b wahrscheinlich 16ploid, c, d mehrere Metaphasen (in Flächen- und Seitenansicht) in einer Zelle. Vergr. etwa 2000.

dritte eiförmig und eingeschnürt ist. Die Kernwandbildung kann ganz unterbleiben, sie kann aber auch eine teilweise sein (Abb. 2f, g). Wo der Kern durchschnürt ist, liegen die Nucleolen ebenfalls geteilt symmetrisch auf jeder Seite, ein ungeteilter, größerer Nucleolus liegt an der von der Zwischenwand nicht erreichten Stelle (Abb. 2g). Derartige Lagebeziehungen der Kernkörper sind durch die schönen Untersuchungen von HEITZ (1931) bekanntgeworden. Der Kern Abb. 2h verdankt seine eigenartige Gestalt einer nur zur Hälfte erfolgten Durchschnürung, der Nucleolus ist aufgeteilt. Der im Teilungsvorgang entstandene Doppelkern Abb. 2i läßt zwischen den Teilungshälften nur eine schwach differenzierte Grenzzone, aber keine Wand erkennen. Auch hier sind die Nucleolen symmetrisch geteilt, vier liegen auf jeder Seite und jeder entspricht größenmäßig seinem gegenüberliegenden Paarling.

Die zuerst auftretenden polyploiden Mitosen sehen normal aus, weder Gestalt noch Lage der Metaphasechromosomen zeigen etwas Besonderes. Abb. 3a, b sind eine tetraploide, und eine vermutlich 16ploide

Metaphase. Teilungsstörungen können rein mechanisch verursacht sein, wenn mehrere Kerne in einem Zellraum in verschiedener Lage sich gleichzeitig teilen (E.S. 1936 b, Abb. 1 a, b). Abb. 3c, d zeigen Metaphasen teils in Flächen-, teils in Seitenansicht. Später ist die Zahl der Kerne in einem

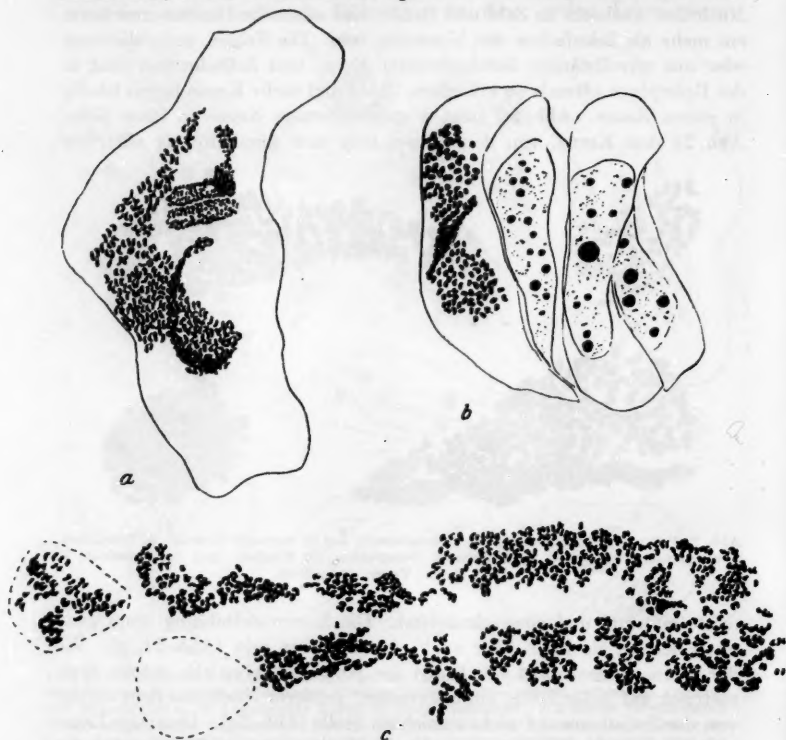


Abb. 4a—c. Starke Chromosomenvermehrung in einem Zellraum. a In einem Kern mehrere polyploide Metaphasen und (rechts oben) zwei frühe Anaphasen. b Erster Gestaltswechsel der Metaphasechromosomen (vgl. Abb. 5). Zur Polyploidisierung durch innere Teilung kommt es hier noch nicht. c Riesen-Anaphase. Die schraffiert umzogene Chromosomengruppe ist vermutlich durch den Druck bei Anfertigung des Präparates aus ihrer ursprünglichen Lage (schraffiert angedeutet) entfernt worden. Vergr. etwa 900.

Zellraum häufig noch größer. Abb. 4a zeigt in einem Zellraum die Mitosen mehrerer polyploider Kerne, die nicht ganz synchron verlaufen. Man sieht zwei Anaphasen neben den Metaphasen. Die mögliche, überaus starke Vermehrung der Chromosomenzahl ist in Abb. 4c verdeutlicht. Die Gewebe sind weitgehend mixoploid, immer finden sich neben den entarteten hochgradig polyploiden Gewebsanteilen solche mit der

normalen diploiden Zahl. In den ruhenden Zellen liegen die Kerne vielfach verklumpt, ohne daß ihre Zahl festzustellen ist.

Über die in meinen früheren Arbeiten beschriebenen erblichen, durch Radiumstrahlung erzeugten, krebigen Entartungen von *Antirrhinum* hat DONTCHO KOSTOFF 1938 zum zweiten Mal irreführende Angaben gemacht<sup>1</sup>.

KOSTOFF führt aus, daß ich den Befund krebiger Entartung behauptet habe, in Wirklichkeit handle es sich aber in meinem Stamm (es sind zwei ganz verschiedene Stämme!) nur um gelegentlich auftretende einzelne Zellen oder Zellgruppen mit vermehrter Chromosomenzahl. Die Erscheinungen seien eben solche, wie jedes Tapetum sie zeigt, und wie sie in den Verdauungsorganen der Stechmücke vorkommen. Meine Arbeiten, die die histologischen Vorgänge der erblichen Entartungen schildern, sind von KOSTOFF nicht zitiert<sup>2</sup>. Die Abbildungen der ersten Arbeit 2b, 3b, 4b, 5, 6, 8, 9, 11, 13b, 14, 17 und die der zweiten, Abb. 3, 4 und 6 beweisen zur Genüge, daß es sich um Desorganisationen handelt, die mit der Polyploidisierung und dem Zellzerfall des normalen Tapetums nicht vergleichbar sind. Abb. A 17a und b zeigen überdies Antherendurchschnitte, mit *entarteten* Tapetenzellen, die fast das ganze Antherenfach ausfüllen und große Chromosomenmassen enthalten (vgl. auch E.S. 1936b, Abb. 4). Eine derartige Entwicklung des Tapetums kommt in der normalen Pflanze niemals vor. Der Vergleich mit der seither von BERGER (1938) näher untersuchten, regulären Polyploidisierung in der Stechmücke dürfte ebenso abwegig sein. KOSTOFF beanstandet, daß meine Pflanzen keine äußeren Tumoren entwickeln. Ich erwidere, daß äußere Neubildungen für die Vorgänge im Inneren kein Kriterium sind. KOSTOFF erhebt weiter den Vorwurf, daß Colchicin und Acenaphten ja die gleichen Erscheinungen hervorrufen. Ich erinnere daran, daß meine Arbeiten über erblich krebige Entartungen einige Jahre vor den ersten Veröffentlichungen über Colchicinwirkung erschienen sind. Erblich induzierte Vorgänge sind in jedem Falle etwas anderes, als einmalig durch irgendein Agens hervorgerufene Störungen und im besonderen ist die cytologische Auswirkung des Colchicins und Acenaphtens von der der *canc*-Erbanlage wesentlich verschieden (vgl. S. 331).

<sup>1</sup> In einem Sammelreferat „Tumor problem in the light of researches on PLANT tumors and galls and its relation to the problem of mutation (1933)“ wurden meine Befunde ohne Zitat irgendeiner Arbeit als „non heritable deformancies“ bezeichnet, obwohl die Erblichkeit längst erwiesen war (E.St. 1930 u. 1932). Ich habe 1934 Herrn KOSTOFF schriftlich auf seinen Irrtum aufmerksam gemacht. Die Darstellung KOSTOFFS im J. Genet. 1938 versuchte ich zunächst richtigzustellen, indem ich nach Anfrage beim Herausgeber (PUNNETT) eine englische Zusammenfassung meiner den Stoff behandelnden Arbeiten mit reichlichem Bildmaterial für die gleiche Zeitschrift verfaßte. Die Veröffentlichung dieser im März 1939 eingesandten Arbeit wurde durch den Krieg verhindert.

<sup>2</sup> STEIN, E.: Z. Vererbgslehre 69, 303—326, für die aus Gruppe A und Z. Vererbgslehre 70, 525 für die aus Gruppe B.

### Der Gestaltswechsel der Chromosomen.

Nach den eingangs gemachten Ausführungen über die Entartung des postembryonalen Gewebssystems und seine Polyploidisierung ist es klar, daß der Nachweis einer etwaig zusätzlichen endomitotisch erfolgten Chromosomenvermehrung auf statistischem Wege nicht erbracht werden kann. Die unmittelbare Beobachtung ergab aber früher nicht zugängliche Möglichkeiten für die Beurteilung des Geschehens.

Die ersten Veränderungen an den Chromosomen selbst wurden in einem 48 Tage nach der Aussaat fixierten Material gefunden. Zunächst

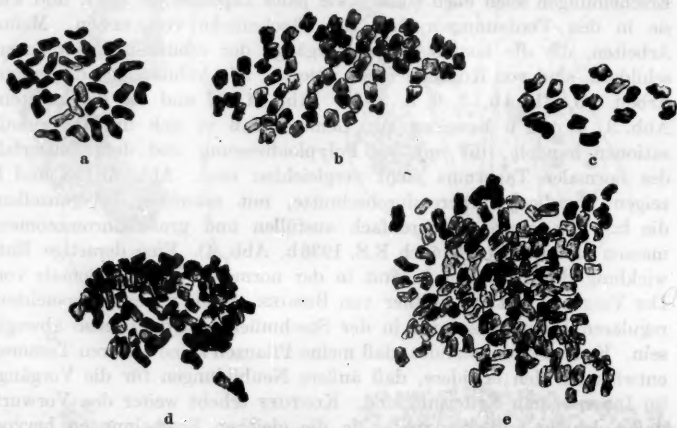


Abb. 5. Gestaltsveränderung der Metaphasechromosomen. a Zunehmende Verkürzung und Verbreiterung. c—e Sichtbarwerden eines Längsspaltcs. Vergr. etwa 2000.

nur vereinzelt auftretend und schwach entwickelt, nahmen sie mit der Annäherung an die Blühephase einerseits an Häufigkeit zu, andererseits erfuhr ihre Ausprägung eine allmähliche Steigerung. Die Veränderungen der Chromosomen sind an keine Valenz gebunden, sie erscheinen sowohl in diploiden Kernen als in solchen der verschiedensten Polyploidstufen; aber immer enthalten die gleichen Präparate auch Gewebsstücke, in deren Mitosen die Chromosomen ganz normal aussehen.

Zunächst fanden sich Metaphasen, deren Chromosomen in verschiedenem Grade verbreitert und häufig auch verkürzt sind (Abb. 5a). Mit fortschreitender Entwicklung wird ein anfänglich nicht sichtbarer Mittelspalt deutlich (Abb. 5b—e). Vergleicht man die Bilder mit denen der normalen Chromosomen (Abb. 3), so sieht man, daß eine Volumenzunahme vorliegt. In der weiteren Entwicklung der Pflanzen können dann die Metaphasen jene schon bekannte Form annehmen, die 1934 und 1935 in prämeiotischen Archespor (E.S. 1936b) so charakteristisch

auftrat. Ganz einheitlich sind hier die Chromosomen stark verkürzt und an der Spindelansatzstelle eingeschnürt (Abb. 6). Der Zusammenhang mit den eben geschilderten Metaphasen läßt erkennen, daß hier eine weitere Entwicklung vorliegt. An Stelle eines zuerst nur angelegten Längspaltes ist die Zweiteilung erfolgt. Die Zweiergruppen sind demnach nicht gepaarte Chromosomen, sondern das Produkt endomitotischer Trennung. Eine Reduktion findet also nicht statt. In dem früheren Material war diese Entwicklungsstufe vorherrschend, hier ist sie viel seltener, sie zeigt aber die gleiche auffallend regelmäßige Anordnung der Zweiergruppen (1936b, Abb. 8, c, d, e; 1936b, Abb. 9 IV, V und 1936a, Abb. 5b). Eine gewisse Kürzung zeigen auch die endomitotisch entstandenen, gepaarten Chromosomen beim Spinat (GENTCHEFF und GUSTAFSSON, 1939a, Abb. 13, 15, 21 u. a.), doch ist die Kontraktion geringer und ihre Form sonst nicht verändert.

Zu einer Chromosomentrennung kommt es in dem abweichenden Vorgang nicht, diese wird vielmehr erst durch die Spindel der Mitose bewirkt. Die frühere Beobachtung (1936b, S. 276 oben), daß die beiden Glieder der Zweiergruppen zu den entgegengesetzten Polen wandern, ist richtig, denn die eingeschnürte Gestalt der Partner ist noch in den Anaphasen deutlich (Abb. 6b und E.S. 1936b, 8 X und 9 VII) und ebenso stimmt die Zählung der Anaphasechromosomen (1936b, Abb. 8 X). *Eine Polyploidisierung erfolgt also hier nicht, die Chromosomenzahl bleibt die gleiche* (vgl. GEITLER 1941, S. 33).

Die Spindel wird durch Eisenkarmin nicht gefärbt. Daß sie in diesen Mitosen auffallend stark entwickelt ist, wurde 1936b (Abb. 9 VI) gezeigt.

*Eine Erscheinung also, die früher in ihrer Regelmäßigkeit als der Höhepunkt einer Umgestaltung angesehen wurde, ist in Wirklichkeit eine durch die Mitose unterbrochene Entwicklungsstufe der inneren Teilung.*

Eines der Hauptargumente für meine frühere Annahme einer Reduktion war die Paarung der späten Prophase, in der die Glieder der Zweiergruppen weiter voneinander getrennt sind, als in der anschließenden Metaphase (1936b, Abb. 8 IV, VI, VII und VIII rechts). Die Beobachtung bleibt bestehen, die Spalthälften der Chromosomen können in dieser Phase frei voneinander liegen ohne Bindung an Centromer. Eine

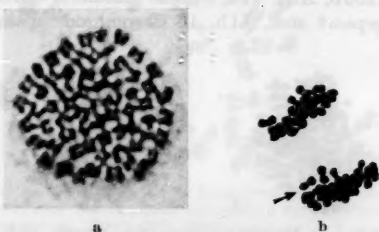


Abb. 6. a Metaphase (octoploid). Chromosomen extrem kontrahiert, eingeschnürt und durchgeteilt. Die Trennung der Spalthälften erfolgt in der Mitose. Mikrophot. Vergr. etwa 1800. b Anaphase der folgenden Mitose. Die Gestalt der Spalthälften ist unverändert deutlich. Vergr. etwa 1600.

solche ist in der früheren Prophase (1936b, Abb. 8 II) noch sichtbar (vgl. GÜTLER 1941, S. 33) und auf entsprechende neue Befunde kommen wir noch zurück. In der heutigen Deutung ist die Beobachtung nur verständlich, wenn man annimmt, daß zwischen den vollständig getrennten Spalzhälften eine nachträgliche autonome Annäherung erfolgt, deren Eindruck durch die zunehmende Kontraktion und Verdickung freilich verstärkt wird.

Außerhalb des prämeiotischen Archespors waren früher einzelne Metaphasen gefunden worden, die als Übergänge vom normalen zu dem dort so charakteristisch entwickelten Teilungsmodus gedeutet wurden: 1936b, Abb. 11a, normal gestaltete Chromosomen, die zum großen Teil gepaart sind, 11b, 16 Chromosomenpaare, von denen nur einige kon-

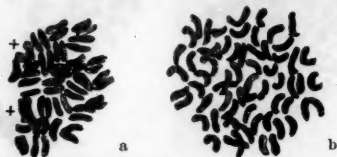


Abb. 7. a Metaphasechromosomen, gepaart, nach vollendeter innerer Teilung. An zwei Stellen ++ ist die Konfiguration unklar. b Eine lockere Paarung an einigen Stellen noch deutlich, an anderen bereits gelöst. Vergr. etwa 2000.

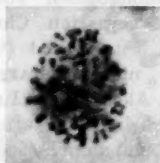


Abb. 8. Anaphasenplatte. Zweiergruppen, am Rande deutlich, die vermutlich aus einer Vierergruppenmetaphase hervorgegangen sind. Mikrophot. Vergr. etwa 1500.

trahiert und eingeschnürt sind). Als Übergangsbildungen sind diese Metaphasen auch heute aufzufassen, aber jetzt im Sinne einer *Weiterentwicklung der Endomitose*.

Diese Weiterentwicklung ist in dem vorliegenden Material deutlich geworden. Nicht selten fanden sich nämlich normalgestaltete, aber zu Paaren angeordnete Metaphasechromosomen (Abb. 7a). *Der Vorgang der außerhalb der Mitose sich vollziehenden Längsteilung ist hier im Zeitpunkt der mitotischen Metaphase fertig durchgeführt, und seit der zuletzt abgelaufenen Kernteilung ist die Chromosomenzahl verdoppelt.* Der Nachweis solcher vollendeter Endomitosen ist natürlich wichtig. Abb. 7b zeigt eine Metaphase, in der nur die lockere Paarung eines Teiles der Chromosomen noch auf eine vorangegangene innere Teilung schließen läßt.

Neben den charakteristischen Zweiergruppen des prämeiotischen Archespors fanden sich manchmal *Vierergruppen*, damals fälschlich „Octaden“ genannt (1936b, Abb. 9 VIII, IX, Abb. 12 I—III und 1936a, Abb. 5c), die wie die ersteren in Ausbildung und Anordnung von großer Regelmäßigkeit waren. Die Entwicklung der Zweiergruppen läßt darauf schließen, daß auch die Vierergruppen durch Chromosomenwachstum und Längsteilung entstehen, also durch Volumenzunahme und nochmalige

Spaltung jedes Gliedes der Zweiergruppe. Der Befund von Übergangsbildungen in der Metaphase bestätigt diesen Entstehungsvorgang. Oft findet man Chromosomen vom Umfang einer Vierergruppe mit nur einem Mittelspalt, die zweite Längsspaltung ist noch nicht erfolgt (Abb. 11 a  $\nearrow$ ). Im Jahre 1936 (b) waren einzelne Anaphasen beschrieben, deren Chromo-

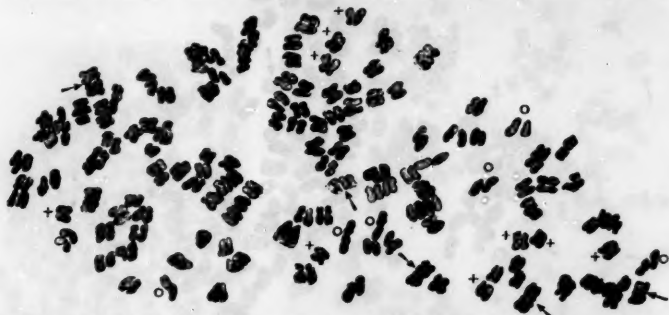


Abb. 9. Metaphase. Vierergruppen  $\nearrow$ , die teilweise schon in Zweiergruppen  $\times \times$  auseinander gelöst sind. Diese scheinen sich zum Teil in Einzelchromosomen zu trennen oo. (Nur einige bezeichnet.) Vergr. etwa 2000.

somen eingeschnürt und streng gepaart waren (1936b, Abb. 12 IV). In ihnen wurden die Anaphasen der Vierergruppen-Metaphasen vermutet. Die gleichen Anaphasen fanden sich auch jetzt vereinzelt (Abb. 8) und es ist wahrscheinlich, daß es sich auch hier um Anaphasen Zweier-

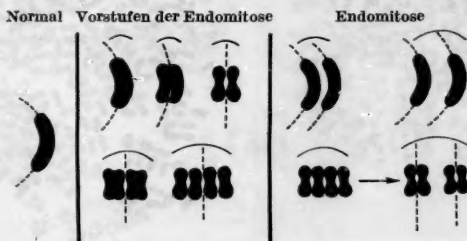


Abb. 10. Schema der gefundenen Metaphasechromosomen in endomitotischer Entwicklung. Der obere Bogen umfaßt ein Chromosom der vorangegangenen Mitose. Die schraffierte Linie bezeichnet die Längsteilung in der folgenden Mitose.

gruppen handelt, die mitotisch aus einer Vierergruppe hervorgegangen sind. Wenn das richtig ist, dann führt in diesem Fall die starke Substanzzunahme der Chromosomen noch *nicht* zur Verdoppelung ihrer Zahl, es handelt sich wieder um eine *unvollendete* innere Teilung, die hier in anderer Form in die Mitose übergeht. Freilich ist nicht zu ersehen, was aus den Anaphase-Zweiergruppen wird, ob nicht aus jeder dieser Gruppen in der folgenden Ruhe- und Prophase statt eines Chromosoms

deren zwei entstehen. In dem Falle würde die Vierergruppen-Endomitose erst im Rahmen des nächsten mitotischen Cyclus zur Vollendung kommen. Sie kann diese Vollendung allerdings auch schon in

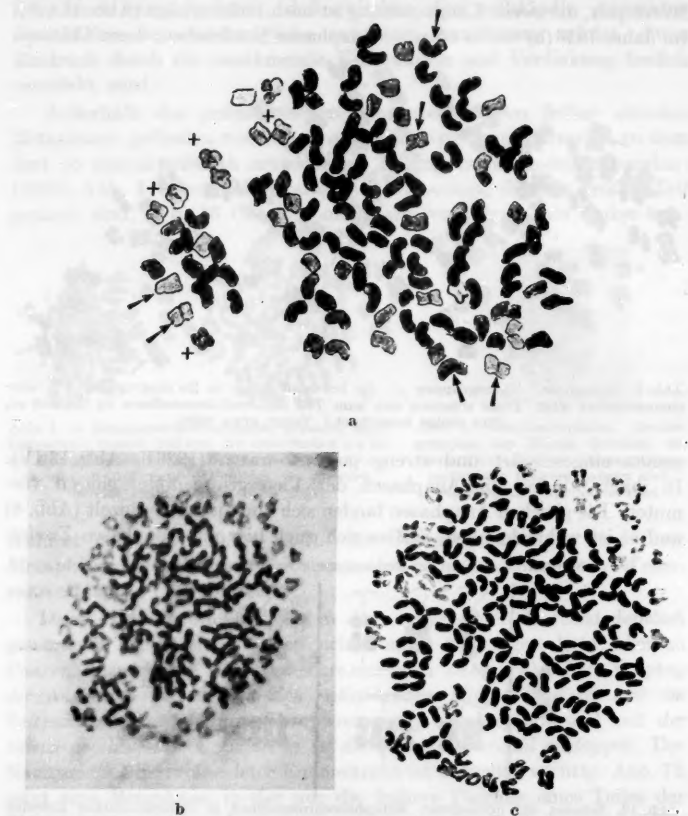


Abb. 11. Metaphasechromosomen in einem Kern auf verschiedenen Entwicklungsstufen der Endomitose. a Chromosomen verbreitert. Gegen den Rand zu heller gefärbte Zweiergruppen ++ und nicht voll entwickelte Vierergruppen  $\nearrow$ . b, c Die gleiche Metaphasenplatte (b Mikrophotogr. Vergr. etwa 1500). In der Mitte stark gefärbte, etwas verbreiterte Einzelchromosomen, peripher gelegen heller gefärbte, voll entwickelte Zweiergruppen. c Vergr. etwa 1900.

der Metaphase des ersten Cyclus erreichen, nämlich dann, wenn hier die vollentwickelten Vierergruppen bereits in ihre Zweiergruppen aufgeteilt sind. Abb. 9 zeigt an einem Teil der Chromosomen, daß das möglich ist. An einigen Stellen scheinen auch die Zweiergruppen bereits

auseinandergelöst. Jede vollständige Trennung der Spalzhälften bedeutet Verdoppelung der Chromosomenzahl.

Die verschiedenen Entwicklungsstufen, die die Endomitose bis zur mitotischen Metaphase erreicht, und andererseits ihre verschiedenen

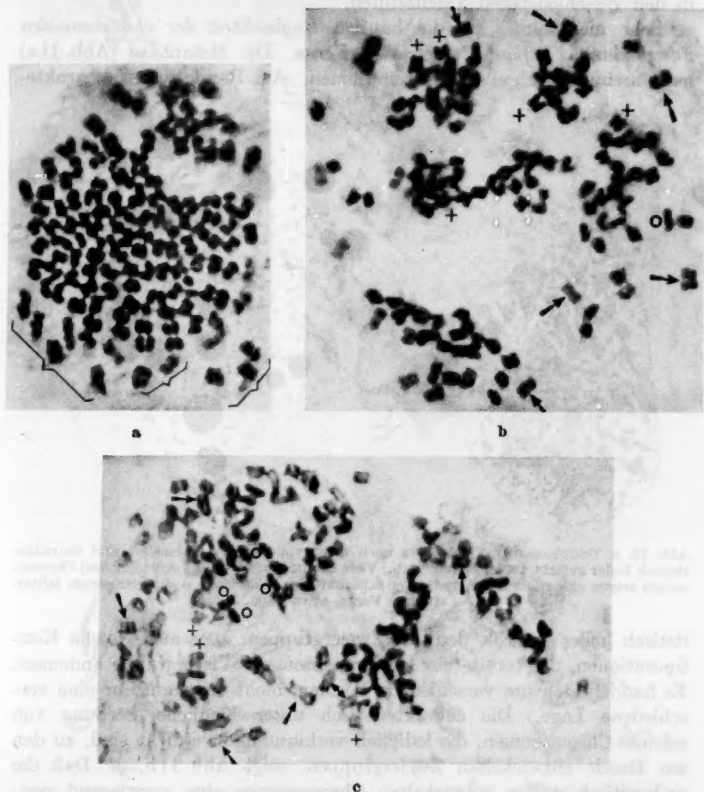


Abb. 12. a—c Verschiedene Chromosomenformen in einer Platte. a In der Mitte Zweiergruppen, deren Glieder besonders stark verbreitert, aber ohne Einschnürung sind. Am Rande Vierergruppen } (in anderer Ebene und darum weniger deutlich). b, c Metaphasen mit verbreiterten Einzelchromosomen oo, Zweier- ++ und Vierergruppen  $\nearrow$  verschiedener Entwicklung (nur einige sind bezeichnet). Mikrophot. Vergr. etwa 1900.

Formen sind in Abb. 10 schematisch zusammengestellt. Die zuletzt als möglich hingestellte Aufteilung der Vierergruppen in vier Einzelchromosomen wurde nicht berücksichtigt.

Schon aus der Verschiedenheit der bisher beschriebenen Metaphasen geht hervor, daß von einem gleichgerichteten Ablauf der inneren

Teilung keine Rede sein kann. Im gleichen Gewebestück findet man einerseits Metaphasen, deren Chromosomengestalt und -Lage eine ganz normale ist, man findet Zweiergruppen normaler Gestalt, Zweier- und Vierergruppen veränderter Form, und dazu alle möglichen Übergänge in den verschiedensten Valenzstufen.

Sehr merkwürdig ist die häufige *Ungleichheit der chromosomalen Formbildung innerhalb des gleichen Kerns*. Die Metaphase (Abb. 11a) hat durchweg verbreiterte Chromosomen. Am Rande liegen, charakte-

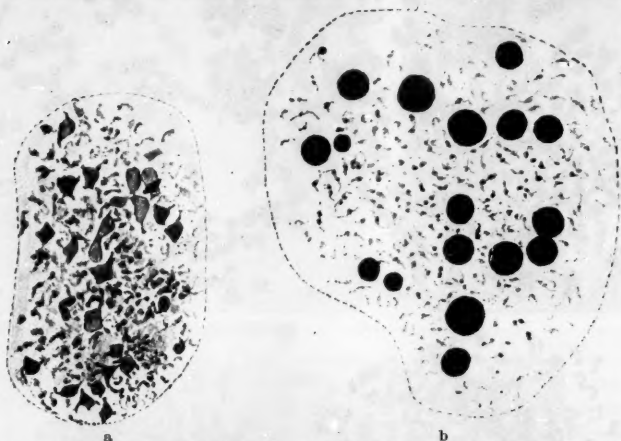


Abb. 13. a Telophase. Die Nukleolen noch nicht vollständig kondensiert und charakteristisch heller gefärbt als im Ruhekern b. Viele der (längst nicht alle gezeichneten) Chromosomen zeigen einen heterochromatischen Abschnitt an jeder Seite des verlängerten Mittelstücks. Vergr. etwa 1800.

ristisch heller gefärbt, deutlich Zweiergruppen, aber auch solche Konfigurationen, die bereits ein Heranwachsen zur Vierergruppe andeuten. Es handelt sich um verschiedene Formen, nicht etwa um nur eine verschiedene Lage. Die charakteristisch unterschiedliche Färbung von solchen Chromosomen, die lediglich verkürzt und verdickt sind, zu den am Rande entwickelten Zweiergruppen, zeigt Abb. 11b, c. Daß die endomitisch weiter entwickelten Chromosomen eine vorwiegend periphere Lage haben, ist auffallend. Das kann mechanisch bedingt sein, es ist aber auch möglich, daß für die an der Spindel nach außen liegenden Chromosomen noch Stoffaustauschmöglichkeiten bestehen, die die innen verankerten nicht mehr haben. Seltene Übergangsbildungen sind die Chromosomen der Metaphase Abb. 12a. Die Mitte ist erfüllt von deutlichen Zweiergruppen, deren Glieder stark kontrahiert und stark verdickt, aber ohne Einschnürung sind. Am Rande liegen Vierergruppen (in anderer Ebene und darum weniger deutlich). Die Metaphasen 12b



Abb. 14. Endomitotisch sich teilende Chromosomen in der frühen Prophase der Mitose. (Nicht alle gezeichnet.) a Im oberen Teil des Kernes ist die Chromosomenspaltung sichtbar, die Spaltheilften sind umeinandergeschlungen, b, c, d die Umschlingung löst sich allmählich. An manchen Stellen besteht der Zusammenhang nur noch am Centromer oo. Einzelne Spaltheilften liegen bereits frei nebeneinander ++. d Sichtbarwerden eines zweiten Längsspaltes  $\nearrow$ . Sehr große deformierte Nucleolen. (Nicht alle Chromosomen gezeichnet.) Vergr. etwa 2200.

und c enthalten verbreiterte Einzelchromosomen, Zweier- und Vierergruppen.

Wenn der Vorgang des Kernwachstums zur Zeit der mitotischen Metaphase innerhalb eines Gewebeanteiles verschiedene Entwicklungsgrade erreicht, wenn er außerdem verschiedene Formen annimmt, und dazu nicht einmal innerhalb eines Kerns gleichmäßig verläuft, so ist anzunehmen, daß die Chromosomenstruktur auch in den anderen Phasen verschiedenartig ist. Es wird aber oft nicht möglich sein, die verschie-

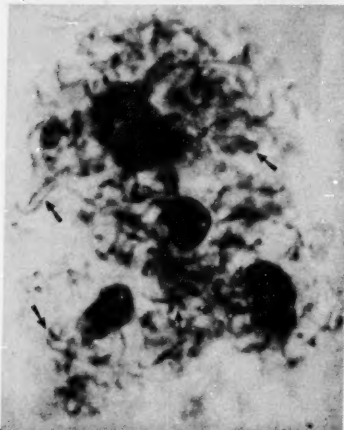


Abb. 15. Gepaarte Chromosomen in früher Prophase  $\gamma$ . Vier große deformierte Nucleolen. Mikrophot. Vergr. etwa 2000.

denen Phasen entwicklungsge-  
schichtlich miteinander zu ver-  
binden. In der späten Telophase  
und im Ruhekern sind charakte-  
ristische Merkmale für das Ent-  
stehen einer inneren Teilung nicht  
zu finden. Wohl sind in den  
vielfach riesigen Kernen die  
Chromosomen deutlicher als in  
den kleinen  $2n$ -Kernen des nor-  
malen Somas, aber das Bild ist  
überall das gleiche. Abb. 13a  
zeigt eine Telophase in der die  
Nucleolen noch nicht vollständig  
kondensiert sind. Sie sind noch  
nicht kugelförmig und erscheinen  
mit E.C.-Färbung immer heller,  
als die vollentwickelten Nucleolen  
des Ruhekerns Abb. 13b. Viele  
der Chromosomen — sie sind  
längst nicht alle gezeichnet —

haben hier eine charakteristische Gestalt. An beiden Seiten des ver-  
längerten Mittelstücks ist ein heterochromatischer Abschnitt sichtbar.

Die frühen Prophasen werden durch die E.K.-Quetschmethode der Beobachtung zugänglicher, als sie es in den Schnittpräparaten waren. Hier besteht eine große Ähnlichkeit mit den Befunden von GENTCHEFF und GUSTAFSSON (1939a) beim Spinat, die durch diese Prophasen einen letzten Beweis für die Endomitose (double reproduction) erbrachten (S. 357). Nach dem früher Gesagten ist es nicht zu verwundern, wenn die gleiche Phase wiederum verschiedene Entwicklungsstufen erkennen läßt.

Die Chromosomen mancher Prophasekerne sind gespalten, die Teil-  
hälften vielfach umeinander gewickelt. In Abb. 14a ist der Spalt wohl  
im oberen, nicht oder nur an einzelnen Stellen im unteren Teil des Kerns  
erkennbar. Die Umschlingung der Spalthälften wird allmählich ge-  
löst, die Enden spreizen auseinander (Abb. 14b, c, d) und oft besteht  
eine Verklebung nur noch am Centromer (vgl. E.S. 1936b, Abb. 8 II).

Der doppelte Spalt durch den GENTCHEFF und GUSTAFSSON beim Spinat zwei Chromatiden in jeder Spalthälfte nachweisen konnten, ist bei *Antirrhinum* nur an einigen Stellen klar zu sehen (Abb. 14d  $\nearrow$ ). In dieser Phase der noch wenig kontrahierten Chromosomen finden sich immer solche, die wohl noch gepaart, aber doch ganz frei nebeneinander liegen (Abb. 14b, c, d und Abb. 15). In allen diesen Fällen muß also wie beim



Abb. 16. Verschiedene Entwicklung endomitotischer Chromosomen im Zeitpunkt der späteren mitotischen Prophase (nicht alle Chromosomen gezeichnet). a (nur einmal beobachtet). Die teils stark verkürzten Chromosomen haben einen Längsspalt, aber die Spalthälften hängen zusammen. b Die vorangegangene ganz durchgeführte Endomitose ist nur noch an der Paarung der meisten Chromosomen kenntlich. c, d weitere Lösung der Spalthälftenumschlingung (vgl. Abb. 14b, c, d). c = der Kern der Mikrophot. 17b.

Vergr. etwa 2100.

Spinat die Längsteilung der Chromosomen vor der der Beobachtung zugänglichen Prophase erfolgt sein.

In der späteren Prophase werden die Verschiedenheiten in der Entwicklung noch deutlicher. Sowohl das Maß der Kontraktion als der Grad der Trennung sind sehr variabel. Eine nur einmalige Erscheinung war ein Prophasekern (Abb. 16a). Die Chromosomen sind noch im Raum verteilt, zum Teil sind sie einerseits besonders stark verkürzt, während ein Spalt wohl sichtbar ist, aber kein Auseinanderweichen der

**Spalthälften.** Es ist nicht denkbar, daß eine solche Konfiguration aus den oben beschriebenen Prophasen hervorgeht, in denen die Trennung der Spalthälften ja schon weiter vorgeschritten ist. Solche Frühprophasen

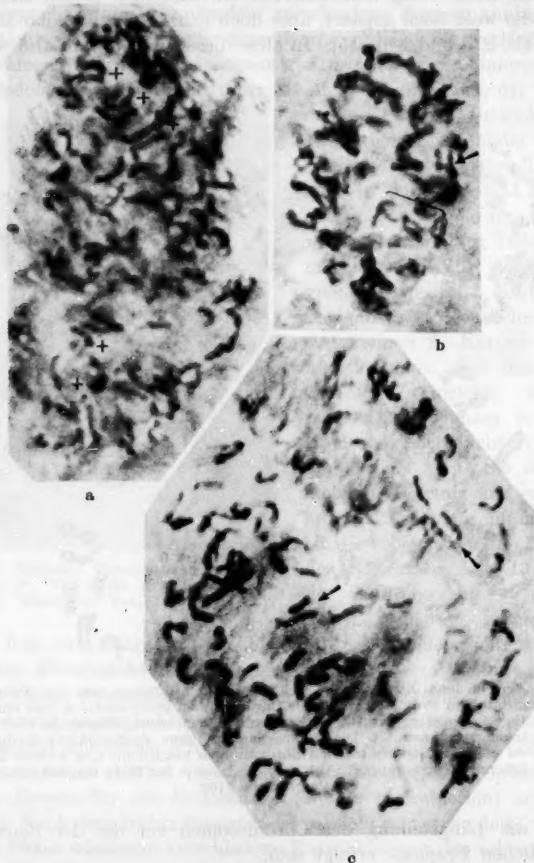


Abb. 17. Späte Prophasen. (Mikrophotographie.) a Gepaarte Chromosomen frei nebeneinander ++. b Kern Abb. 15c (Text dort). c Nur noch einige Chromosomen gepaart  $\surd$ , andere in freier Lage. Mikrophot. Vergr. etwa 2000.

lösen unter zunehmender Kontraktion und Verdickung allmählich die Umschlingung (Abb. 16c, d, 17b). Auch in der *späten Prophase* kann die Trennung der Spaltprodukte schon eine vollständige sein. Sie liegen dann frei zu zweien nebeneinander (Abb. 16b; 17a). Aber selbst die

Paarung kann schon wieder gelöst werden, und wenn nicht einige Chromosomen sie noch beibehalten würden (Abb. 17c), so hätte die vorangegangene endomitotische Teilung kein Merkmal mehr. Ob solche Fälle der frühen, vollen Durchführung hier vorkommen, ist also nicht nachzuweisen. Sie sind aber denkbar, denn bei *Sauromatum guttatum* (I. GRAFL 1939) trennen sich die endomitotisch entstandenen Chromosomengruppen bereits vor ihrer Einordnung in die Platte.

Auch in den Prophasen können also Endomitose und Mitose ineinandergreifen. Die Endomitose kann verschieden weit entwickelt sein, bevor eine Einordnung in die Metaphasenplatte von den Kräften der Mitose übernommen wird.



Abb. 18. Deformierte Nucleolen, an deren vorgezogenen Enden die Chromosomen anhängen. a Prophase. b Nucleolus noch sichtbar, während die Chromosomen bereits die Metaphasekontraktion erreicht haben. a Vergr. etwa 2200. b Mikrophot. etwa 2000.

Alle auf dem Wege zur Endomitose veränderten Kerne liegen in sehr großen Zellräumen, aber die riesigen Zellen sind, wie wir früher sahen, schon vorhanden, bevor in den Chromosomen selbst ein Gestaltswechsel beobachtbar ist. Und immer handelt es sich um mixoploide Gewebe, in denen die verschiedensten Polyploidstufen nebeneinander liegen. Aus diesen Gründen ist ein statistisches Erfassen von Zellgrößen im Zusammenhang mit dem Chromosomenwachstum der Endomitose nicht möglich. Daß schon eine unvollkommene Endomitose immer in stark vergrößertem Zellraum und in stark vergrößertem Lumen sich abspielt, geht noch am klarsten aus dem 1936(b) beschriebenen prämeiotischen Teilungen des Archspors hervor, wo eine Vorstufe der Endomitose sich einheitlich entwickelt. Sehr große plasmaarme Zellen und sehr große Kerne charakterisierten immer diejenige Zellgruppen, in denen regelmäßig die veränderten Teilungen auftraten (E.St. 1936b, S. 272; Fig. 5 u. 6).

In dem desorganisierten Gewebe weicht, zunehmend mit der Annäherung an die Blütenbildung, auch das Verhalten der Nucleolen oft von der Norm ab. Starke Formveränderungen im Übergang zu ihrer

Auflösung, sind schon in Abb. 14b zu sehen. Dort sind aber die Chromosomen nicht mitgezeichnet, die auffallend häufig den weit vorgeschobenen Spitzen anhängen (Abb. 18a). Der Nucleolenkörper ist vielfach

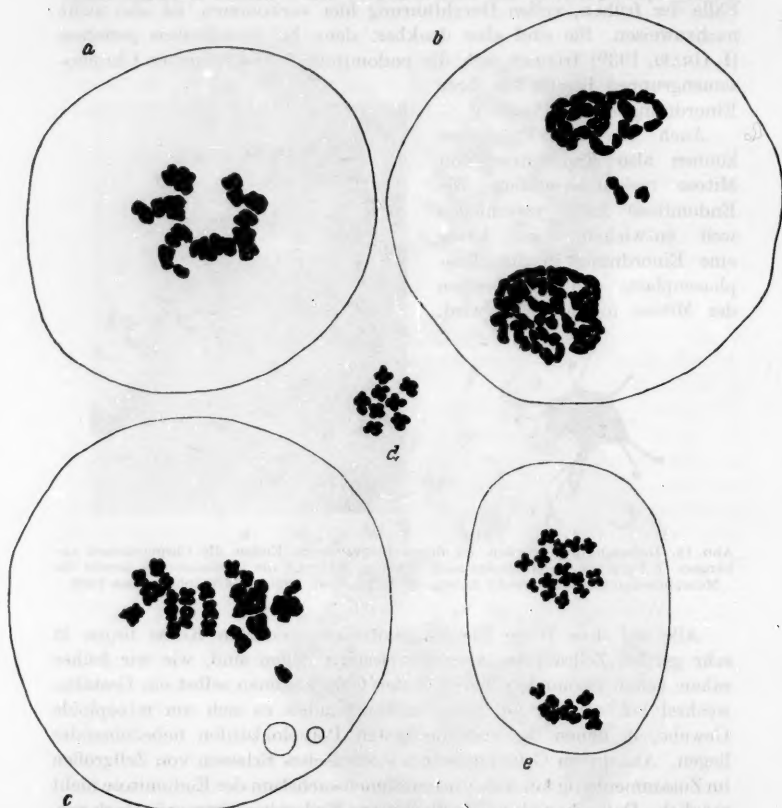


Abb. 19. Phasen der Meiosis mit Wachstumserscheinungen und Gestaltsveränderungen der Chromosomen. (Nach HEITZ-Präparaten 1935.) a Diakinese, b Interkinese. Volumenzunahme der Chromosomen. c: IM, d, e: IA. Die Chromosomen haben die eingeschnürte Gestalt, die gleichzeitig im prämeiotischen Archespor so häufig war. Die PMZ, a, b, c sind abnorm groß. In c ist unten bei schwacher Vergrößerung der Umriss von c mit einer daneben liegenden, normalen PMZ gezeichnet. Vergr. etwa 2100.

von großen Vakuolen durchsetzt, seine Auflösung ist verzögert. Die Nucleolen können noch sichtbar sein, wenn die Chromosomen bereits ihre metaphasische Kontraktion erreicht haben (Abb. 18b).

Im Jahre 1935 wurden an Quetschpräparaten nach HEITZ (Kochmethode 1926) einige Beobachtungen der cancroidea Meiosis gemacht,

die in der Hoffnung auf eine gründliche Untersuchung in der Arbeit von 1936(b) noch nicht verwendet wurden. Diese Untersuchung gehörte mit zur diesjährigen Aufgabe. Sie ist aber nicht geglückt, weil der Gestaltswechsel der Chromosomen in der meiotischen Phase ebenso ausgeblieben ist, wie in der prämeiotischen. Es kann darum nur an Hand damaliger Zeichnungen darauf hingewiesen werden, daß auch innerhalb der Meiosis endomitotisches Chromosomenwachstum vorkommen kann. In PMZ variablen, oft großen Formats, können die Chromosomen selbst verdickt und vergrößert sein (Abb. 19a, b). Zahlreich waren PMZ verschiedener Entwicklungsphasen mit eingeschnürten gepaarten Chromosomen, denen des prämeiotischen Archespors ähnlich (Abb. 19c, d, e). Die Vorgänge sind auch hier unabhängig von einer auf anderem Wege schon erfolgten Polyploidisierung. Ob eine solche auf endomitotischem Wege voll durchgeführt werden kann, ist zur Zeit nicht zu entscheiden. GENTCHEFF und GUSTAFSSON (1939 b) fanden in *Hieracium robustum* PMZ, deren Chromosomen über eine bestimmte Grenze hinaus wachsen und ihre Zahl verdoppeln. Trotz dieser „double-reproduction“ vollziehen sich in den PMZ Teilungen, die ihrem Charakter nach meiotisch sind. Daß endomitotische Vorgänge in den PMZ experimentell auslösbar sind, konnte BARBER feststellen (1940). Die Meiosis bleibt auch in den cancroidea-PMZ gewahrt, ihre Phasen; Diakinese, Interkinese, IM und IA sind deutlich, und die IA-Platte (Abb. 19d) zeigt mit 8 Chromosomen die vollzogene Reduktion an. Restitutionskerne, in denen die Chromosomen ganz zerstreut liegen, bilden häufig zusammenhängende Gruppen (Abb. 20). Die Chromosomen haben hier eine den IA-Chromosomen ähnliche Gestalt, sind aber größer als diese. Tetraploide und höherwertige PMZ wurden auch in diesem Jahr häufig beobachtet, aber ohne Form- oder Größenänderung der Chromosomen, die auf irgendwelche Entwicklungsstadien der inneren Teilung schließen ließ.

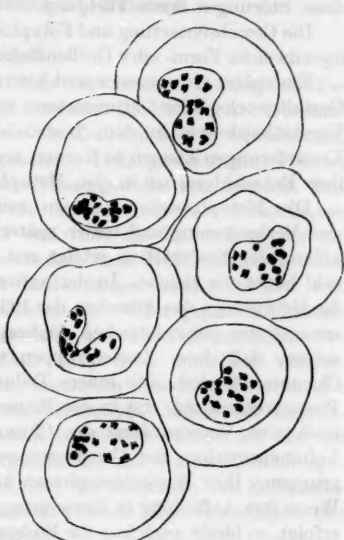


Abb. 20. Restitutionskerne in einer Gruppe von PMZ mit großen Chromosomen. Vergr. etwa 900.

### Zusammenfassung.

Die cane-Keimlinge sind diploid. Durch früh einsetzende, regellose Teilungsstörungen, Unterbleiben der Zellwandbildung, unvollständige oder fehlende Entwicklung der Kernwände entstehen mixoploide Gewebe wechselnder Polyploidstufen. Zellen und Kerne wachsen zu oft riesenhaften Gebilden heran. Auch in der älteren Pflanze finden diese Störungen ihren Fortgang.

Die Gewebsentartung und Polyploidisierung sind also entwickelt, bevor irgendwelche Form- oder Größenänderungen der Chromosomen auftreten.

Ein später einsetzender und bis zur Blütenbildung sich verstärkender Gestaltswechsel der Chromosomen wurde im wesentlichen unterhalb des Vegetationskegels in dem postembryonalen Sproßteil gefunden. Alle Veränderungen können in Kernen verschiedenster Valenz vor sich gehen, ihre Entwicklung ist in den Metaphasen am besten zu verfolgen.

Die Metaphasechromosomen zeigen eine zunehmende Verkürzung und Verbreiterung und bilden späterhin einen Längsspalt aus. Die Aufteilung der Spalthälften erfolgt erst mit der Mitose, die Chromosomenzahl bleibt die gleiche. In der weiter herangewachsenen Pflanze können die Metaphasen das Aussehen der 1936 (b) beschriebenen „Doppelchromosomen“ des prämeiotischen Archespors haben. Die Wachstumsphasen zeigen, daß diese Zweiergruppen endomitotische Abkömmlinge eines Chromosoms sind. Die innere Teilung wird aber hier unterbrochen, die Paare trennen sich erst in der Mitose, und es liegt weder eine Reduktion noch eine Verdoppelung der Chromosomenzahl vor. Eine auffallende Volumenzunahme der Chromosomen erfolgt in der Bildung von Vierergruppen. Ihre Wachstumsphasen können ebenfalls beobachtet werden. Wenn ihre Aufteilung in Zweiergruppen erst durch die mitotische Spindel erfolgt, so bleibt auch hier die Endomitose unvollständig und die Chromosomenzahl unverändert.

Die Vierergruppen können aber in der Metaphase bereits in ihre Zweiergruppen aufgeteilt sein, und solche Chromosomen haben durch Vollendung der inneren Teilung ihre Zahl verdoppelt.

Die Polyploidisierung auf dem Wege der inneren Teilung kann auch in anderer Form erfolgen: Metaphasechromosomen ganz normaler Gestalt liegen häufig in strenger oder bereits mehr oder weniger gelockerter Paarung. Die Endomitose ist auch hier zum Abschluß gelangt.

Die Vorgänge sind wechselnd und sehr labil. Sie verlaufen häufig nicht einmal einheitlich innerhalb des gleichen Kerns.

Die in Endomitose befindlichen Chromosomen sind in der frühen Prophase längsgespalten. Die Spalthälften sind nur zuerst umeinander geschlungen. Manche Längshälften können bereits in dieser Phase ohne Bindung gepaart nebeneinander liegen. In anderen Fällen löst sich die Umschlingung erst in der späteren Prophase.

Im prämeiotischen Archespor sind die endomitotischen Vorstufen in diesem Jahr nicht aufgetreten, ebensowenig waren sie im Cyclus der

Meiosis zu beobachten. Daß sie aber auch hier vorkommen können, wurde aus früherem Material erwiesen.

Es muß angenommen werden, daß das zur Endomitose führende Chromosomenwachstum bei den *canc*-Pflanzen weitgehend von Außenbedingungen (Licht und Wärme) abhängig ist.

Die gesamten Erscheinungen sind der Ausdruck einer durch Radiumbestrahlung erzeugten, rezessiv mendelnden Mutation.

### Schluß.

Die bisher näher untersuchten Fälle der inneren Teilung bei Tier und Pflanze spielen sich innerhalb des normalen Geschehens ab. Die *canc*-Mutation von *Antirrhinum* entwickelt die Endomitosen in Geweben mit regellosem Zellwachstum und weitgehenden Teilungsstörungen. Frühere Befunde gepaarter Chromosomen im Tumorgewebe von Mensch, Tier und Pflanze wurden 1936 zitiert. Sie müssen heute als Endomitosen gedeutet werden. WINGE hat 1928 und 1930 die Entstehung der gepaarten Chromosomen in Mäusecarcinomen und Rüben Tumoren schon richtig beurteilt. Demnach treten Endomitosen häufig in den verwildert wachsenden, großzelligen Geweben auf. Über gepaarte Chromosomen innerhalb der Nachkommenschaft aus radiumbestrahlten Petunienpflanzen soll demnächst (Biol. Zbl.) kurz berichtet werden. Die von mir beschriebenen erblichen, besonders extremen Entartungen aus Gruppe A in der gleichen *Antirrhinumsippe* haben die Begleiterscheinungen der Endomitose niemals entwickelt. Diese ist also an ganz bestimmte Formen der Desorganisation mit wahrscheinlich spezifisch chemischen Reaktionen gebunden, die innerhalb des Zellwachstums zum Wachstum der Chromosomen führen. Die Grundlagen des Chromosomenwachstums sind ungeklärt.

LEVAN (1939) hat an *Allium* Wurzeln nach Wuchsstoffzufuhr Chromosomenwachstum und Chromosomenverdoppelungen beobachtet, welche letztere erst auftraten, wenn die vorher entwickelten Riesenzellen der Wurzelrinde, die aber noch diploid sind, ein gewisses Alter erreicht hatten. Die Chromosomenverdoppelung vollzieht sich in der Ruhephase, auch unabhängig von der Mitose. Die am Spindelansatz noch verbundenen Doppelchromosomen erinnern an die von WHITE (1935) nach Röntgenbestrahlung bei *Locusta migratoria* beobachteten „Diplochromosomen“. Der Wuchsstoff als chemisches Agens hat also eine cytologische Wirkung, die einzelne Ähnlichkeiten mit der *cancroidea*-Entwicklung aufweist: Erstens in der Entstehung riesiger Zellen, zweitens im Chromosomenwachstum und ihrer Verdoppelung. Die Wuchsstoffwirkung ist damit grundlegend verschieden von der des Colchicins (LEVAN 1938 u. 1940), das bekanntlich die Spindelfunktion aufhebt, und damit die Anaphasebewegung hindert.

Bei den Tieren verläuft die Endomitose von der Mitose getrennt. Bei den Pflanzen können die Vorgänge miteinander abwechseln, so

daß eine Mitose die vorangegangene Endomitose überdeckt und ihre Spur (Chromosomenpaarung) verwischt (beim Spinat: GENTCHEFF und GUSTAFSSON). Im cancroidea-Falle greifen die beiden Cyclen noch inniger ineinander; das Wachstum der Chromosomen, ihr Gestaltswechsel und ihre Spaltung kann verschiedene Stufen erreicht haben, wenn die einsetzenden Spindelkräfte eine Trennung durchführen. Die verschiedenen Entwicklungszustände der Endomitose im Zeitpunkt der Metaphase zeigen, daß der Ablauf der Mitose in verschiedenen Phasen der endomitotischen Chromosomenreife erfolgen kann.

Die Endomitose des normalen Geschehens vollzieht sich in frühen Phasen, sie ist in der mitotischen Metaphase immer vollendet. GERTLER (1941, S. 31) weist besonders darauf hin, daß „kein Fall natürlicher Entwicklung bekannt ist, in dem die Chromosomenabkömmlinge in der Metaphase noch zusammenhängen“. In der cancroidea-Endomitose ist das anders: in der Metaphase können die Chromosomen manchmal nur eine Gestaltsveränderung erreicht haben, die als Vorstufe der inneren Teilung zu deuten ist. Sie können bereits gespalten sein, aber die Spalthälften bleiben im Sinne der Endomitose verbunden, weil erst die Mitose sie auseinandertrennt.

Die endomitotische *Formbildung* der canc-Chromosomen kann sehr verschieden sein und es bleibt unerklärt, was die Ursache dieser Verschiedenheit ist. Abgesehen von der Größenzunahme in den Vierergruppen ist der Gestaltswechsel am ausgeprägtesten da, wo außer der starken Kontraktion der Spalthälften eine Einschnürung an der Insertionsstelle erscheint, die im normalen Metaphasechromosom nie zu sehen ist. Die Chromosomenkontraktion, für die eine maximale Spiralisierung angenommen werden muß, ist viel stärker, als normale Metaphasechromosomen sie je erreichen.

Das Chromosomenwachstum, vor allem die Bildung der Vierergruppen, wurde immer in stark hypertrophischen Zellen und Kernen beobachtet. Daß es in Bezirken solcher Wachstumsvorgänge zur inneren Teilung kommt, deutet auf Zusammenhänge mit der Endomitose in der normalen Entwicklung von Pflanze und Tier. „Es scheint schon jetzt, daß bei Tieren wie bei Pflanzen die höchsten Polyploidiegrade (durch Endomitose, E.S.) in Zellen mit gesteigerter trophischer Funktion erreicht werden“ (GERTLER 1941, S. 46).

Im gleichen Zusammenhang sind GENTCHEFF und GUSTAFSSON (1939b) der Meinung, daß „growth phenomena act as reproduction forces“ (S. 243). Und die S. 89 beschriebenen, riesigen Auxin-Zellen in den Experimenten LEVANS (1939), die nachträglich Endomitosen entwickeln, deuten in dieselbe Richtung. Abweichend von den bisher bekannten Fällen der Endomitose ist vor allem die Tatsache, daß sie in den canc Pflanzen an irgendeiner Stelle unterbrochen werden, bzw. zum Stillstand kommen kann.

## Literaturverzeichnis.

- Barber, H. N.:** The Suppression of Meiosis and the Origin of Diplochromosomes. Proc. roy. Soc. Lond. B 128, 170 (1940). — **Berger, Ch. A.:** Multiplication and Reduction of Somatic Chromosome Groups as a Regular Developmental Process in the Mosquito *Culex pipiens*. Contrib. to Embryol. 167, 211 (1938). — **Dermen, Haig:** Intracellular Polyploidy, in Bean induced by Naphthalene Acetic Acid. J. Hered. 1941. — **Ernst, H.:** Meiosis und Crossing over. Cytologische und genetische Untersuchungen an *Antirrhinum majus* L. Z. Bot. 33, 241 (1939a). — Zytogenetische Untersuchungen an *Antirrhinum majus* L. Z. Bot. 34, 81 (1939b). — **Geitler, L.:** Über den Bau des Ruhekerns mit besonderer Berücksichtigung der Heteropteren und Dipteren. Biol. Zbl. 58 (1938a). — Über das Wachstum von Chromozentren, Kernen und zweierlei Heterochromatin bei Blütenpflanzen. Z. Zellforsch. 28 (1938b). — Die Entstehung der polyploiden Somakerne der Heteropteren durch Chromosomenteilung ohne Kernteilung. Chromosoma 1, 81 (1939). — Das Wachstum des Zellkerns in tierischen und pflanzlichen Geweben. Erg. Biol. 18, 1 (1941). — **Gentcheff, G. and A. Gustafsson:** The Double Chromosome Reproduction in *Spinacia* and its Causes. I. Normal Behaviour. Hereditas (Lund) 25 (1939a). — The Balance System of Meiosis. Hereditas (Lund) 26, 210 (1939b). — **Graff, Ina:** Kernwachstum durch Chromosomenvermehrung als regelmäßiger Vorgang bei der pflanzlichen Gewebedifferenzierung. Chromosoma 1, 265 (1939). — Cytologische Untersuchungen an *Sauromatum gullatum*. Österr. Bot. Z. 89, 81 (1940). — **Heitz, E.:** Der Nachweis der Chromosomen. Vergleichende Studien über ihre Zahl, Form und Größe im Pflanzenreich. Z. Bot. 18, 625 (1926). — Die Ursache der gesetzmäßigen Zahl, Lage, Form und Größe pflanzlicher Nucleolen. Planta (Berl.) 12, 1 (1931). — **Kostoff, D.:** Tumor Problem in the Light of Researches on Plant Tumors and Galls and its Relation to the Problem of Mutation. (A critical review from biophysical, biochemical and cytogenetic point of view.) Protoplasma (Berl.) 20, 440 (1933). — Studies on Polyploid Plants. XXI Cytogenetic Behaviour of the Allopolyploid Hybrids *Nicotiana glauca* GRAH. × *N. Langsdorffii* WEINM. and their Evolutionary Significance. J. Genet. 37, 129 (1938). — **Levan, A.:** The Effect of Colchicine on Root Mitosis in *Allium*. Hereditas (Lund) 24, 471 (1938). — Cytological Phenomena connected with the Root Swelling caused by Growth Substances. Hereditas (Lund), 25, 87 (1939). — The Effect of Acenaphthene and Colchicine on Mitosis of *Allium* and *Colchicum*. Hereditas (Lund) 26, 262 (1940). — **Stein, E.:** Weitere Mitteilung über die durch Radiumbestrahlung induzierten Gewebeeartungen in *Antirrhinum* und ihr erbliches Verhalten. Biol. Zbl. 50 (1930). — Zur Entstehung und Vererbung der durch Radiumbestrahlung erzeugten Phytocarcinome und ihr erbliches Verhalten. Z. Vererbgslehre 62 (1932). — Weitere Analyse der Gruppe A von den durch Radiumbestrahlung veränderten Erbanlagen von *Antirrhinum*. Kern- und Zellveränderung in der krebssigen Gewebeeartung. Z. Vererbgslehre 69, 303 (1935a). — Zur Genetik, Histologie und Cytologie einer neuen durch Radiumbestrahlung erzeugten krebssigen Entartung von *Antirrhinum majus* (aus Gengruppe B). Z. Vererbgslehre 70, 525 (1935b). — Erbliche, durch Radiumbestrahlung erzeugte Zell- und Gewebeeartung beim Löwenmaul (*Antirrhinum majus*). Naturwiss. 24, 337 (1936a). — Die Doppelchromosomen im Blütenbezirk der durch Radiumbestrahlung erzeugten Mutante *cancroidea* von *Antirrhinum majus*. (Somatische Chromosomen Reduction.) Z. Vererbgslehre 72, 267 (1936b). — **White, M. I. D.:** The Effects of X Rays on Mitosis in Spermatogonial Divisions of *Locusta migratoria* L. Proc. roy. Soc. Lond., Ser. B 119, 61 (1935). — **Winge, Ö.:** Untersuchungen über die Natur maligner Tumoren. I. Grown gall der Zuckerrübe. Z. Zellforsch. 6, 397 (1928). — II. Teerkarzinome bei Mäusen. Z. Zellforsch. 10, 683 (1930).

# POLARISATIONSMIKROSKOPISCHE DEHNUNGS- UND KONTRAKTIONSVERSUCHE AN CHROMATINABSCHNITTEN VON CHARA-SPERMATOZOIDEN.

Von

HANS H. PFEIFFER, Bremen.

Mit 6 Textabbildungen (12 Einzelbildern).

(Eingegangen am 1. März 1942.)

Bei den mikrurgisch-polarisationsmikroskopischen Versuchen mit Chromosomen der Speicheldrüsen von *Chironomus* zur Ermittlung eines submikroskopischen (leptonischen) Bauplans sind von Anfang an die Bedenken CASPERSSON<sup>1</sup> über die Eignung des Objekts erwogen worden<sup>2</sup>. Weil die Riesenchromosomen larvaler Speicheldrüsen nur einen Spezialfall im Verhalten der Kernsubstanz darstellen, sind daneben auch früher schon Versuche mit Objekten weniger spezialisierten Verhaltens angestellt worden, auch wenn diese den Vorteil jener Riesenchromosomen, *mikroskopisch* in nucleinsäurehaltige und -freie Abschnitte (Chromomeren und Interchromomeren) gegliedert zu sein, nicht aufweisen. Über einen Teil dieser inzwischen fortgesetzten Versuche, soweit sie mit *Chromatinabschnitten* von *Chara-Spermatozoiden* und vergleichsweise mit *tierischen Spermienkernen* vorgenommen worden sind, soll hier kurz berichtet werden, weil bei diesen Objekten das native Chromatin entgegen CASPERSSON<sup>3</sup> auch schon *vor* Behandlung mit fixierenden oder dehydrierenden (allgemein: ent quellenden) Agentien und *ohne* besondere Versuchseingriffe Doppelbrechung zeigt. Obgleich bekanntlich<sup>4</sup> Gele und Lösungen von Thymonucleinsäure sehr leicht durch ent quellende Eingriffe (Alkoholbehandlung, Trocknen) und mechanische Einwirkungen orientiert und doppelbrechend gemacht werden, ist also bei den hier benutzten Materialien — ähnlich wie bei den früher untersuchten Speicheldrüsenchromosomen — bereits vor Beginn der mikrurgischen Dehnung und ohne jegliche Vorbehandlung — eine sogar recht beträchtliche — negative Doppelbrechung vorhanden.

## Methodische Vorbemerkungen.

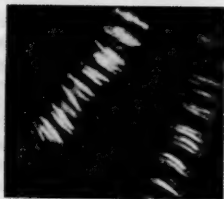
In der Erwartung, daß „trotz verschiedenen Aussehens der ♂ Geschlechtskerne diese doch enger mit Spermatozoiden verknüpft sind, als man meist denkt“<sup>5</sup>, sind

<sup>1</sup> CASPERSSON, T.: *Chromosoma* 1, 562, 587f. (1941). — <sup>2</sup> PFEIFFER, H. H.: *Chromosoma* 1, 526, 527 (1940); 2, 77, 84 (1941). — <sup>3</sup> CASPERSSON, T.: *Chromosoma* 1, 605, 608 (1941). — S. aber auch SCHMIDT, W. J.: *Chromosoma* 2, 86, 88f. (1941). — <sup>4</sup> SCHMIDT, W. J.: *Handbuch biol. Arbeitsmethoden* (X) 5, 435, 648f. (1934). Die Doppelbrechung von Karyoplasma, Zytoplasma und Metaplasma, S. 92f., 97. Berlin 1937. — <sup>5</sup> TISCHLER, G.: *Allgemeine Pflanzenkaryologie*, 2. Aufl., Bd. 1, S. 25. Berlin 1934.

hauptsächlich in Kulturversuchen von *Chara aspera* (DETH.) WILD. (f. *tenuissima*) und weniger häufig von *Ch. seliculata* Ag. erhaltene Spermatozoiden zu den Dehnungsversuchen benutzt worden. Die unerläßliche Forderung einheitlichen Versuchsmaterials wird durch solche Kulturen, die gut gedeihen und reichlich fruktifizieren, sicher gewährleistet. In dem an der roten Färbung kenntlichen reifen Antheridium sieht man die spermatogenen Fäden zusammengeknäuelnd durch die Wand hindurchscheinen und von den zylindrischen Manubrien ausgehen. Im polarisierten Lichte sind die in den Chromatinkörper der Spermatozoiden sich verwandelnden Kerne der scheibenförmigen Zellen der spermatogenen Fäden negativ zur späteren Längsachse doppelbrechend (Abb. 1a u. b); an den in anderen Fällen ebenfalls optisch anisotrop gefundenen Cilien ist Doppelbrechung hingegen nicht mit Sicherheit festzustellen. Experimenteller Isolierung der ausgebildeten Spermatozoiden bedarf es eigentlich kaum, da sie nach Ausreifen und Schlüpfen relativ leicht erhalten werden können (Abb. 2). Die geschlüpften, umherschwärmenden Spermatozoiden zeigen bei Anwendung polarisierten Lichtes Doppelbrechung nur im mittleren („Chromatin-“) Abschnitt und manchmal an geeignet gelegenen Teilen der Cilien. Ohne besondere Mühe ist nach Einfangen des Objekts ein mehr oder minder langer Abschnitt des mittleren Spermatozoidenkörpers, den wir polarisationsmikroskopisch und färbereich als „Chromatin“ ansprechen, zu isolieren und für die mikrurgischen Versuche zu benutzen (Abb. 3). Trotzdem sind häufig auch mit einer nach CHAMBERS<sup>1</sup> hergestellten Mikronadel halbausgereifte Spermatozoiden isoliert und entsprechende Versuche an ihrem Chromatinabschnitt angestellt worden. Zur Herstellung solcher Mikronadeln wird bekanntlich in dem Augenblick, in welchem ihre Spitze in den Mikrobrenner gehalten wird, eine Drehung derart vorgenommen, daß das Ende der Glasnadel in einer Entfernung von etwa 20–30  $\mu$  hinter der Spitze hakig umgebogen wird; so entsteht ein feiner Haken mit einer sehr dünnen, konischen Spitze auf relativ festem Schenkel.

Auf Anraten von Prof. Dr. W. J. SCHMIDT, Gießen, dem ich dafür sehr zu Dank verpflichtet bin, ist auch versucht worden, an den nach Isolierung im polarisierten Lichte isotropen Samenfäden von *Paludina spec.* durch mikrurgisches Dehnen Doppelbrechung hervorzurufen und zu messen. Die Ergebnisse sind aber noch zu wenig zahlreich, als daß darüber mehr als ein paar kurze Notizen gebracht werden könnten, welche wegen des Vergleiches erwünscht erscheinen. Wegen der großen Bedeutung für die Frage der Orientierbarkeit des Chromatins sollen solche Versuche zu günstigerer Zeit der Materialbeschaffung fortgesetzt werden.

Zur Messung der optischen Anisotropie ist wie bei den früheren Versuchen die empfindliche Methode von D. BRACE und A. KÖHLER mittels Glimmerplättchens



a



b

Abb. 1a und b. Polarisationsmikroskopische Ansicht der spermatogenen Fäden von *Chara*, deren Kern sich bereits weitgehend in den Chromatinkörper der Spermatozoiden verwandelt hat, <sup>270/1</sup> (nach W. A. BECKER).



Abb. 2. Eben geschlüpftes Spermatozoid von *Chara*, <sup>270/1</sup>.

<sup>1</sup> CHAMBERS, R. and H. C. SANDS: J. gen. Physiol. 5, 815 (1923).

Grau I ( $\frac{1}{16}$   $\lambda$ -Glimmerplättchen; E. Leitz, Wetzlar) angewandt worden, zu welcher SCHMIDT<sup>1</sup> ausführliche Arbeitsvorschriften gegeben hat. Die zur größeren Bequemlichkeit der Messungen konstruierte Eichkurve (PFEIFFER<sup>1</sup>) muß allerdings zum Ablesen auch der höheren Gangunterschiede entsprechend erweitert werden.

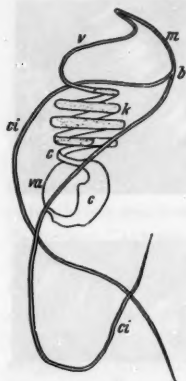


Abb. 3. Schematische Gliederung eines *Chara*-Spermatozooids; es bezeichnet: *k* Schraubengänge des Karyoplasmas, *c* cytoplasmatische Schraubengänge und cytoplasmatischer Anhang, *m* vakuolärer Anteil des Cytoplasmas, *v* Verbindungstück, *m* beweglicher Teil, *b* Basalkörper, *ci* die beiden Cilien.

Das Dehnen isolierter Chromatinabschnitte gelingt auf die gebräuchliche Art mittels feiner Spitznadeln nicht immer leicht. In solchem Falle empfiehlt es sich, die Nadeln durch feine Capillaren zu ersetzen, mit denen die Objekte sicherer angefaßt und verlängert werden können. Die Genauigkeit der Dehnungsverlängerung steigt mit der Bewegung der mikrurgischen Nadeln bzw. Capillaren (oder einer derselben) mittels angeschlossener Mikrometervorrichtung; es bedarf dann nur der anfänglichen Längenmessung und des Ablesens des experimentell vorgenommenen Entfernens der beiden Spitzen der Mikroinstrumente. Über die zum Einspannen der Objekte erforderlichen Manipulationen genügen folgende kurze Hinweise. Man hebt zuerst den Tubus, entfernt Okular und Objektiv des Instrumentes und spannt die Mikroinstrumente in die Halter ein und bringt sie in die Nähe der Sehfeldmitte, wovon man sich beim Hindurchblicken durch den Tubus leicht überzeugen kann. Dann wird der Halter gesenkt, um das Objektiv ebenso wie das Okular wieder anzubringen, und wieder gehoben, bis die Spitzen der Mikroinstrumente deutlich im Sehfeld erscheinen. Schließlich wird der Tubus gesenkt und auf das Objekt und die Spitzen der Mikroinstrumente eingestellt. Sobald dann die Länge des gefaßten Chromatinabschnittes mit möglicher Genauigkeit gemessen worden ist, kann durch Bewegen der Mikrometerschraube der Dehnungsvorrichtung der Dehnungsversuch vorgenommen werden.

Eine Kontraktion der nach Loslassen oft nur unvollkommen die initiale Länge wieder annehmenden Chromatinabschnitte (s. S. 340) erreicht man am besten und meist in wenigen Minuten durch tropfenweises Hinzufügen schwach verdünnter  $\text{HNO}_3$  zu den in der Mikrokammer in Brunnenwasser befindlichen Objekten oder durch bloßes Eintauchen in ein derart angesäuertes Medium. Noch sorgfältiger lassen sich die Versuche durchführen, indem man längere Zeit (bis 10 oder 15 Min.) Essigsäuredämpfe auf die experimentell gedehnten Objekte einwirken läßt.

### Befunde an ungedehnten, gedehnten und kontrahierten Objekten.

1. Das Chromatin der Kerne der *Spermatozoidmutterzellen*, das sich färbereicher als ein über den ganzen Kern verteiltes Retikulum darstellen läßt, tritt polarisationsmikroskopisch noch nicht hervor, sondern erweist sich als isotrop. Auch wenn sich nach dem letzten Schritt der Reifeteilungen die beginnende Spermatogenese durch Wanderung des Kernes an die eine Seite der jetzt flachen Zellen der spermatogenen Fäden an-

<sup>1</sup> SCHMIDT: Handbuch biol. Arbeitsmethoden, a. a. O. 535f. — S. auch PFEIFFER: Chromosoma 2, 78 (1941).

kündigt und der Kern merklich die Struktur zu variieren beginnt, bleibt er noch lange isotrop. Erst bei den dann einsetzenden Prozessen der Umformung, welche wir bei *Chara*-Arten hauptsächlich durch Untersuchungen von G. BERTHOLD, L. GUIGNARD, WL. BELAJEFF, D. W. MOTTIER, FR. MEVES, J. S. KARLING und neuerdings W. LINDENBEIN und H. TELEŻYŃSKI genauer kennen<sup>1</sup>, tritt *allmählich zunehmende Doppelbrechung* auf (Abb. 1; 4). Erste Spuren optischer Anisotropie findet man gewöhnlich in jenem Stadium, in welchem der ganze Kern eine Kontraktion (Entquellung?) erfährt und seinen Durchmesser von 6–7  $\mu$  auf nahezu die Hälfte (3,8  $\mu$ ) reduziert. Ein erheblicheres Ansteigen der Doppelbrechung

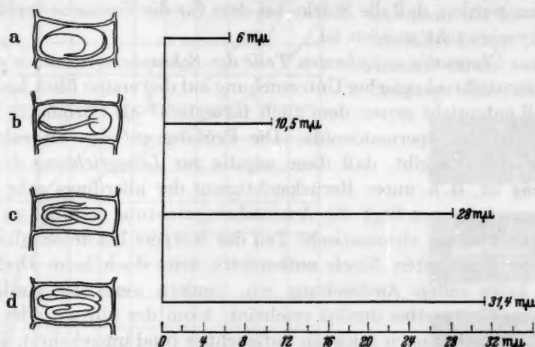


Abb. 4a–d. Vier Stadien der *Formumwandlung des Kernes* der Zellen spermatogener Fäden bis zum fast ausgereiften Spermatozoid (d), gezeichnet bei <sup>1909</sup>,, nebst graphischer Angabe der Steigerung der polarisationsmikroskopisch gemessenen *Gangunterschiede* (in m $\mu$ ).

findet sich sogar erst mit der dann bald einsetzenden Verdichtung (und Homogenisierung) der Kernmasse und mit der Formumwandlung zu einer Sichel oder schließlich zu dem schraubigen Chromatinumgang des Spermatozoidkörpers. Die optische Anisotropie der Zellkerne in ausgereiften spermatogenen Fäden wird bereits von BECKER<sup>2</sup> angegeben, doch hat er weder das allmähliche Auftreten der Doppelbrechung verfolgt, noch Messungen dazu angestellt. *Mit der Formveränderung des Chromatins in den Zellen der spermatogenen Fäden steigen also die Werte der Gangunterschiede schrittweise an* (Abb. 4a–d), obwohl die Dicke des Chromatinabschnittes mit fortschreitender Streckung des Spermatozoidkörpers (also die vom polarisierten Licht transmittierte Schichtdicke) dabei beträchtlich reduziert wird.

<sup>1</sup> Die Literatur ist zuletzt gesammelt worden bei TISCHLER: a. a. O. 21f., 111, 284f. u. a. — Vgl. auch FR. MEVES: Arch. mikrosk. Anat. (II) 91, 272. 292f. (1918). — LINDENBEIN, W.: Planta 4, 437, 460f. (1927). — MÜHLDOERF, A.: Bot. Arch. 30, 167 (1930). — VALKANOV, A.: Protoplasma 36, 247 (1942). — <sup>2</sup> BECKER, W. A.: Protoplasma 29, 255 (1938).

2. Zu den Dehnungsversuchen ist nur der mittlere Teil des *Spermatozooids* benutzt worden (Abb. 3c), nicht das Vorderende und nicht das hintere mit den untersten  $1\frac{1}{2}$  Schraubenumgängen und den Cilien; alle diese Teile sind gleich einer äußeren Hülle des Chromatins (A. YUASA „borderbrim“) von cytoplasmatischer Beschaffenheit. Nach MÜHLDOERF<sup>1</sup> sollen in den *cytoplasmatischen* Schraubengängen durch Jodreagentien nachweisbare *Stärkekörner* vorkommen. Polarisationsmikroskopisch ist die Stärke aber in den untersuchten jungen Stadien bis gleich nach dem Schlüpfen der Spermatozoiden weder an einem Auslöschungskreuz, noch am Aufleuchten nachweisbar gewesen. Vielleicht muß angenommen werden, daß die Stärke bei dem für die Versuche verfügbaren Material verbraucht worden ist.

Die aus Chromatin aufgebauten Teile der Schraubenwindungen sind bei polarisationsmikroskopischer Untersuchung auf den ersten Blick kenntlich; ihr Anteil entspricht genau dem auch färberisch<sup>2</sup> als Chromatin zu deutenden Teile des Spermatozooids. Die Prüfung auf den Charakter der Doppelbrechung ergibt, daß diese *negativ zur Längsrichtung der Kernerstreckung* ist, d. h. unter Berücksichtigung der allerdings sehr flachen Schraubenwindungen liegt die Auslöschungsrichtung parallel zu diesen. Auch wenn also der chromatische Teil des Körpers bei dessen diagonalen Lage unter gekreuzten Nicols aufleuchtet, tritt doch beim Drehen des Objekts keine *völlige* Auslöschung ein, sondern wenn der vordere Abschnitt des Chromatins dunkel erscheint, kann der hintere oder ein bestimmter seitlicher noch schwach aufleuchten (und umgekehrt). Die Auslöschung geht also parallel der Schraubenwindung des längsgestreckten Chromatinabschnittes (negative einachsige Doppelbrechung). Durch Behandlung des Spermatozooids mit absolutem Alkohol erfährt der Gangunterschied keine oder nur eine ganz unwesentliche Erhöhung, d. h. das Chromatin dürfte im ausgereiften Spermatozoid bereits eine *maximale Entquellung* erreicht haben.

3. Die für die *Dehnungsversuche* isolierten Chromatinabschnitte stellen infolge ihrer Dichte dunkel gefärbte, geloiden, elastische, runde oder abgeflachte Zylinder dar, deren Rindenschicht sich manchmal durch höhere Lichtbrechung von dem inneren Teil unterscheidet. Im Leben lassen sich keinerlei längsverlaufende Faserbildungen erkennen. Bemerkenswerte Befunde ergeben sich bei *Messungen des Gangunterschiedes* ruhender und mikrurgisch gedehnter Chromatinabschnitte. Während das ruhende Chromatin vor dem Entschlüpfen stehender oder bereits geschlüpfter Spermatozoiden Gangunterschiede zwischen 24,0 und 37,9  $m\mu$  zeigt, werden nach Dehnen der Objekte trotz der damit sicher verbundenen Reduktion ihres Querschnittes schnell ansteigende Werte gemessen (Abb. 5; 6). Sorgfältige, genau durchgeführte Messungsreihen lassen zwar für

<sup>1</sup> MÜHLDOERF: a. a. O. 169f., 184f. — <sup>2</sup> GEITLER, L.: Schnellmethoden der Kern- und Chromosomenuntersuchung, 2. Aufl. Berlin 1942.

den ersten Zeitabschnitt beginnender Dehnung eine nahezu lineare Abhängigkeit wachsender Anisotropie und erhöhter Dehnungsverlängerung erkennen. Bei länger fortgesetztem oder bei stärkerem Dehnen aber steigt

die Zunahme der optischen Anisotropie nicht in gleichem Maße, sondern bleibt dann hinter den Werten steigender Längendehnung merklich zurück. Erst bei Verlängerung der Objekte um mehr als 30–40% der initialen Länge finden wir wieder einen schnelleren Anstieg der Kurve der

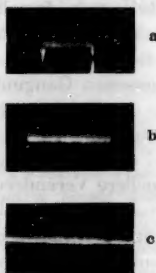
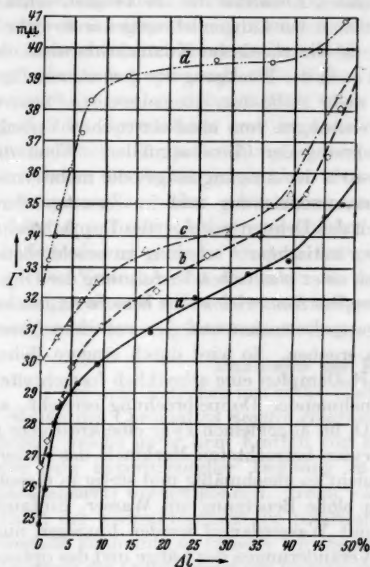


Abb. 6a–c.

Abb. 5. Zunahme des Gangunterschieds  $\Gamma$  (in  $m\mu$ ) mit wachsender Dehnungsverlängerung (in % der Ausgangslänge). Alle Kurven zeigen anfangs lineare Abhängigkeit beider Erscheinungen, dann ein Zurückbleiben der Anisotropiezunahme hinter der Verlängerung der Objekte und schließlich eine (übrigens gleichfalls zeitlich begrenzte) nochmalige Erhöhung der Zunahme der Doppelbrechung. Ziemlich unwesentlich für das Verhalten scheint die absolute Ausgangslänge zu sein, insofern trotz halber Länge des Chromatinabschnittes (hierzu Kurve a) doch fast derselbe Kurvenverlauf wie beim Dehnen eines andern (hierzu Kurve b) resultiert. Die Steilheit der Kurven im Gebiet bis zu 10- oder 15%iger Dehnungsverlängerung hängt nicht nur von dem Ausgangswerte der Gangunterschiede ab, sondern nimmt auch mit zeitlicher Verzögerung fortgesetzten Dehnens ab (Kurve c im Vergleich zu d mit 1 statt  $\frac{1}{2}$  Min. Abstand zwischen aufeinanderfolgenden Dehnungsstufen).

Abb. 6a–c. Dehnung eines Chromatinabschnittes eines Chara-Spermatozoids (a) von einem Gangunterschied  $\Gamma = 24,2 m\mu$  um 87½% (b) bzw. 212½% (c), wobei der Gangunterschied auf 38,9 bzw. 47,7  $m\mu$  anwächst.

Gangunterschiede, welcher dann aber ebenfalls gewöhnlich schnell zum Stillstand kommt. Weitere Dehnungen bis zur Ruptur der zwischen den Mikroskopinstrumenten gefaßten Chromatinabschnitte führen zu keiner weiteren Zunahme der gemessenen Gangunterschiede. Zeitlich beschleunigte Längendehnungen der Abschnitte lassen diese Feinheiten in der Zunahme der optischen Anisotropie nicht oder doch weniger gut erkennen; in solchen Fällen kommt es neben allgemeiner Zunahme der Doppelbrechung schon weit früher zu einer Überwindung der Festigkeitsgrenze der Objekte.

4. Wenn sich das eine Ende des gefaßten Chromatinabschnittes beim Dehnen vorzeitig löst oder nach mäßiger Längendehnung die eine Seite losgelassen wird, erfolgt eine *elastische Zusammenziehung* des Objekts. Diese ist mit einer entsprechenden Abnahme der im Versuch erhöhten Doppelbrechung verbunden. Schon bei Längendehnungen von mehr als 5% der initialen Ausdehnung ist die elastische Kontraktion aber nicht mehr immer vollkommen, und auch der Rückgang des gemessenen Gangunterschiedes entspricht nicht mehr völlig dem Ausgangswerte. Sehr viel auffälliger sind derartige Abweichungen vom ideal-elastischen Verhalten bei beträchtlicherer Längendehnung der Chromatinfäden. Wenn diese eine Längenzunahme um etwa 40% der Ausgangslänge oder mehr erreicht hat, bleiben die elastische Zusammenziehung und im Zusammenhange damit die Restitution der durch das Dehnen gesteigerten Doppelbrechung oft erheblich hinter dem aus elastischem Verhalten zu erschließenden Maße zurück. In solchen Fällen einer *plastischen* Verformung der Objekte kann nur die *chemisch hervorgerufene Kontraktion* eine bessere Angleichung an die Verhältnisse der Ausgangsdimension und der vor dem Versuch gemessenen Gangunterschiede ergeben. So wird durch längere Behandlung der Objekte mit  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ -Dämpfen eine allmählich fortschreitende Kontraktion zugleich mit abnehmender Doppelbrechung erreicht, während die Anwendung von  $\text{HNO}_3$  im allgemeinen zwar eine kräftigere und schnellere Veränderung der beiden betrachteten Merkmale des Materials hervorruft, gelegentlich aber nicht so gleichmäßig und stetig in derselben Richtung wirksam ist. Durch bloße Benetzung mit Wasser, Eintauchen in solches oder Behandlung mit Wasserdampf werden hingegen nur in sehr unbestimmter Weise die Veränderungen der Länge und des optischen Verhaltens restituiert. Gelegentlich hat sich hierbei die Einbettung eines anscheinend weniger gequollenen (stärkere negative Doppelbrechung aufweisenden) Achsenstranges erkennen lassen, welcher in einer stärker gequollenen Substanz (von meßbar geringerer Anisotropie) eingebettet liegt. Bemerkenswert bleibt, daß es gelingt, die kontraktionsauslösenden Mittel ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{HNO}_3$ ) rechtzeitig *auszuwaschen* und so ihren Einfluß wenigstens teilweise zu inhibieren.

5. Zum Vergleich sind schließlich eine kleine Anzahl von *Beobachtungen und Versuchen mit Spermatiden* von *Paludina spec.* angestellt worden. Zum Unterschied von den *Chara*-Spermatozoiden bleiben die Chromatinabschnitte hier unter vitalen Bedingungen auch in der Spermiogenese noch lange Zeit isotrop. Durch *Fixieren mit Alkohol* ist allerdings wie an Spermatiden anderer Gattungen und Arten negative Doppelbrechung zu erzielen. Die Höhe der gemessenen Gangunterschiede hängt dabei anscheinend weit mehr von der Natur des gerade fixierten Objekts als von Konzentration oder Einwirkungsdauer des Mittels ab. Im ganzen eignen sich freilich die älteren, also stärker gestreckten Spermatiden besser als die weniger weit entwickelten, wenn durch Fixieren mit Alkohol Doppelbrechung hervorgerufen werden soll.

Viele Mühe ist darauf verwandt worden, an isotropen Stadien der Spermatiden statt durch Alkoholbehandlung auch durch *mikrurgische Dehnungsversuche* Doppelbrechung zu erzielen. Leider sind diese Versuche zumeist ergebnislos verlaufen. Im allgemeinen reicht wohl die Reißfestigkeit der Objekte nicht hin, um die erforderliche Dehnungsspannung zu überstehen, und bei zu geringen Dehnungsverlängerungen ist eben die optische Anisotropie noch nicht sicher nachweisbar. Es mag hier aber verzeichnet werden, daß mehrfach, wenn trotz eines gewissen Streckungsgrades der Spermatiden und der hohen Empfindlichkeit der Messungsmethode keine Doppelbrechung erkannt worden ist, eine relativ langsame und daher die *Reißfestigkeit nicht übermäßig beanspruchende* Dehnungsverlängerung zu sicher erkennbarer und trotz der geringen Intensität meßbarer optischer Anisotropie geführt hat, welche fast um eine ganze Größenordnung geringer als jene der gedehnten Chara-Spermatozoiden ist. Die Versuche sind also trotz der bisher noch spärlichen Resultate aussichtsvoll und sollen daher nach Beschaffung von reicheren Materialmengen wieder aufgenommen werden.

#### Diskussion der Befunde.

Die Befunde bestärken uns in der Überzeugung<sup>1</sup>, daß die leptonischen Teilchen des Chromatins *negativ einachsige, doppelbrechende Micelle* darstellen, welche unter dem Einfluß von Entquellung (Alkohol-Fixierung) oder von experimenteller Dehnung *in zunehmendem Grade orientiert* (parallelisiert) werden können. Wenn während der aufeinanderfolgenden Stufen der Spermatogenese die polarisationsmikroskopische Anisotropie ebenfalls zunimmt, so müssen wir diesen Effekt ebenso mit einer Verbesserung der Orientierung der leptonischen Teilchen deuten. In gleicher Weise, wie häufig in der tierischen Spermatogenese der Kern der Spermatiden erst allmählich während seiner Umformung zum chromatischen Teil des Kopfes doppelbrechend wird<sup>2</sup>, nimmt von einem bestimmten Stadium bei der Ausbildung von Chara-Spermatozoiden die Anisotropie entsprechend der zunehmenden Streckung des Chromatinabschnittes und offenbar stufenweise verbesserter Orientierung der leptonischen Teilchen zu und erreicht ihr Maximum am Chromatin der entschlüpfenden Spermatozoiden. Die durch Dehnen verlängerten und in ihrem leptonischen Aufbau verstärkt orientierten Chromatinabschnitte kontrahieren sich andererseits durch quellende Mittel bzw. unter Einfluß mancher chemischer Agentien, wie  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$  oder  $\text{HNO}_3$  und nehmen dabei an Querschnitt

<sup>1</sup> SCHMIDT, W. J.: Zool. Jb. 45, 177 (1928). — Arch. Protistenkde 77, 463; 78, 613 (1932). — Handbuch biol. Arbeitsmethoden, a. a. O. 648f. — Die Doppelbrechung usw., S. 99f. u. die dortige Literatur. — Nova Acta Leop. N. F. 7, 1, 21 (1939). — Chromosoma 2, 88f. (1941). — GETTLER, L.: Chromosomenbau, S. 134f. Berlin 1938. — FREY-WYSSLING, A.: Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate, S. 172f. Berlin 1938. — BUCHTHAL, FR. u. G. G. KNAPPEIS: Tabul. biol. 19/1, S. 346, 349f. (1939). — DUSPIVA, FR.: In NORD, F. F. und R. WEIDENHAGEN: Handbuch der Enzymologie, Bd. 1, S. 11, 61f. Leipzig 1940. —

<sup>2</sup> PATTI, H. O. E.: Z. Zellforsch. 16, 723 (1932).

zu und an Intensität der Doppelbrechung ab. Letztere, ausgedrückt durch die Höhe der Gangunterschiede, ist demnach *direkt abhängig vom Quellungsstate* des Chromatins *und von dem Orientierungsgrade* der Packung seiner leptonischen Teilchen (und vermutlich auch der Dichte ihrer Lagerung).

Durch seine Messungen mittels Ultraviolett-dichroismus wird von CASPERSSON<sup>1</sup> zwar gezeigt, daß die polarisationsmikroskopisch nachweisbare Orientierung an den von ihm untersuchten *Drosophila*-Chromosomen nur einen sehr geringen Grad (etwa 3–5%) erreicht. Sicher können weder die einleitend erwähnten früheren, noch die hier behandelten Versuche einen einleuchtenden Grund für eine *totale* Orientierung der mikrurgisch beeinflussten leptonischen Teilchen geben. Daß diese und manche andere zum Auftreten von Doppelbrechung führenden Versuche<sup>2</sup> aber mit einer *Erhöhung des Orientierungsgrades* einhergehen, darf ebensowenig übersehen werden. Wenn ferner bereits ein so geringer Ordnungsgrad polarisationsmikroskopisch nachweisbar ist, so ist das ein deutlicher Beweis für die hohe Empfindlichkeit der Methode<sup>3</sup>. Im übrigen behalte ich mir vor, demnächst noch an anderer Stelle<sup>4</sup> die Beziehungen zwischen Deformations- und Orientierungsgrad durch speziell dazu angestellte Versuche klären zu helfen.

Wir müssen also die Vorgänge der *Spermatogenese* bis zur Ausbildung des reifen Spermatozooids als eine Entquellung des Karyoplasmas der spermatogenen Zellen und als eine Umformung des Chromatins in die maximal orientierte und am stärksten kondensierte, d. i. für die Besamung geeignete, Erscheinungsart auffassen. Die damit einhergehende Streckung des chromatinschen Anteils der Spermatozoidkerne in *einer* Dimension mögen wir dabei grobmorphologisch als Ausdruck des Verlaufes der linearen, parallelgestellten Micelle zuerst einmal der *Nucleinsäure-Komponente* ansehen. Aber auch die eindimensional gestreckten *Polypeptid-Fadenmolekeln*, deren (positive) Doppelbrechung nach unserer heutigen Kenntnis sehr viel schwächer sein muß (auch ja in den Untersuchungen nicht gefunden werden konnte), werden sich sowohl bei der Spermatogenese, als auch bei der experimentellen Dehnung und Steigerung der Orientierung und Packungsdichte der Teilchen einer Parallelorientierung nicht entziehen können. Den Effekt der die normale Spermatogenese charakterisierenden *Wasserentziehung* können wir etwa mit SCHMIDT<sup>5</sup> so deuten, daß dadurch chemische Attraktionskräfte zwischen aufeinanderfolgenden Seitenketten der Polypeptidfadenmolekeln wirksam werden und so eine regelmäßige Fältelung hervorrufen. Vermutlich wird das Verhalten der Polypeptide gegen quellende und chemische Einflüsse polarisationsmikroskopisch durch die infolge stärkerer Anisotropie auffallende Nucleinsäurekomponente verborgen; denn nach der gegenwärtigen leptonischen Einsicht zeigen auch alle Polypeptidfadenmolekeln eines gewissen Streckungsgrades unter quellenden und bestimmten chemischen Einwirkungen ein deutliches Kontraktionsvermögen, indem sie sich

<sup>1</sup> CASPERSSON, T.: *Chromosoma* 1, 605; 2, 247 (1941). — <sup>2</sup> SCHMIDT, W. J.: *Erg. Physiol.* 44, 27, 74f. (1941). — <sup>3</sup> Vgl. auch SCHMIDT, W. J.: *Chromosoma* 2, 86, 104f. (1941). — <sup>4</sup> PFEIFFER, H. H.: *Kolloid-Z.* 100, 254, 262 (1942). — <sup>5</sup> SCHMIDT, W. J.: *Verh. dtsh. Zool. Ges.* 41, 303, 313, 378 (1939).

falten oder gar aufknäueln<sup>1</sup>. Beide Komponenten der Chromatinstränge müssen also sowohl bei den Entquellungsprozessen der Spermatogenese, als auch darüber hinaus im mikrurgischen *Dehnungsversuch* ausgerichtet werden und sich in dichter Packung lagern. Bei den Kontraktionsversuchen dagegen muß aus der Abnahme der Intensität der Doppelbrechung auf den Eintritt *desorientierender Prozesse* an der Nucleinsäurekomponente, wahrscheinlich aber ebenfalls auch an der leptonischen Ordnung der Polypeptidfadennmolekeln, geschlossen werden.

Aus den Versuchen kann leider nicht entnommen werden, ob die Deutung von FAURÉ-FREMIET<sup>2</sup> berechtigt ist, nach welcher auch die *chemische Kontraktion* als eine *thermische bei gesenkter Umwandlungstemperatur* zu gelten hat. Auch wenn bei der kontrahierenden Wirkung der Essigsäure auf die Fadenmolekeln der Spermatozoiden nicht wie bei den ebenfalls schon untersuchten Chromosomen gleichzeitig eine Änderung der *Schraubelungsstruktur*<sup>3</sup> angenommen werden kann, so scheint jener Einfluß an unsern Objekten am ehesten als ein solcher der Quellung anzusehen zu sein<sup>4</sup>. Im andern Falle dürfte die Wirkung der Essigsäure wohl in einer Verstärkung schwacher Schraubelung — also in dem der Wirkung des  $\text{NH}_3$ -Dampfes<sup>5</sup> entgegengesetzten Effekt — bestehen.

Wie den von WOLF<sup>6</sup> untersuchten Spermatidenkern von *Dicranomyia trinitata* dürfen wir offenbar auch den Chromatinabschnitt der Chara-Spermatozoiden nicht als Ruhekerne betrachten, sondern müssen in ihm einen eigentümlichen *Vorbereitungszustand zur Teilung* sehen. So erklären sich wahrscheinlich der hohe Orientierungsgrad im leptonischen Aufbau mindestens der Nucleinsäurekomponente und die Vergleichbarkeit mit dem Bauplan der Chromosomen, welche „im Spaltungszustande . . . die maximal erreichbare Ordnung in der vektoriellen Richtung kleinster Teilchen darstellen“ mögen<sup>7</sup>. So ergibt sich auch als *Bauplan* der untersuchten Chromatinabschnitte im wesentlichen dieselbe Konstruktion, wie sie für die Chromosomen larvaler Speicheldrüsen von *Chironomus* entworfen worden ist<sup>8</sup>. Die dort angenommene Kontinuität der Eiweißgrundlage ist allerdings für das Chromatin der Chara-Spermatozoiden vorerst hypothetisch; aber die orientierte Einordnung der Fadenmolekeln der Nucleinsäure ist genügend gesichert. Nach dem Charakter der Doppelbrechung (negativ zur Längserstreckung der Objekte) kann es sich bei ihrer Orientierung entgegen WRINCH und in Bestätigung von W. J. SCHMIDT<sup>9</sup> nur um parallelen Einbau in das Gerüst der Polypeptidmolekeln handeln. Eine Gliederung in chromatinhaltige und -freie Be-

<sup>1</sup> SCHMIDT, W. J.: *Erg. Physiol.* 44, 27, 39, 88 (1941). — <sup>2</sup> FAURÉ-FREMIET, E. et R. WOELFFLIN: *J. Chim. physique* 33, 801 (1936). — <sup>3</sup> BECKER, W. A. and I. KOZIAL: *Acta Soc. pol.* 14, 239 (1937). — <sup>4</sup> SCHMIDT: Die Doppelbrechung usw., a. a. O. 98. — *Z. Mikrosk.* 56, 1 (1939). — *Protoplasma* 34, 237, 261 (1940). — BECKER, W. A.: *Verh. 5. internat. Zellforsch.-Kongr. Zürich*, 196 (1938). — <sup>5</sup> NAKAMURA, T.: *Fujii Jubil. Vol.*, 482. Tokyo 1937. — <sup>6</sup> WOLF, E.: *Chromosoma* 1, 336 (1939). — <sup>7</sup> PRZIBRAM, H.: *Die anorganischen Grenzgebiete der Biologie* (insbesondere der Kristallvergleich), S. 204. Berlin 1926. S. auch S. 50, 138 u. a. — <sup>8</sup> PFEIFFER: *Chromosoma* 2, 83f. (1941). — Vgl. auch SCHMIDT: *Chromosoma* 2, 97 (1941). — <sup>9</sup> SCHMIDT, W. J.: *Naturwiss.* 26, 413 (1938). — BAUER, H.: *Fortschr. Zool.* 3, 440 (1938). — FREY-WYSSLING, A.: a. a. O. 183f. — DUSPIVA: a. a. O. 62.

zirke ist polarisationsmikroskopisch an den *Chara*-Spermatozoiden wie an den Spermatiden nicht nachweisbar; aus dem quantitativen Verhalten der Doppelbrechung in den Versuchen fortschreitender Dehnungsverlängerung läßt sich indessen folgern, daß wahrscheinlich wenigstens ein Teil der Polypeptidfadennolekeln gefältelt (im  $\alpha$ -Zustande nach W. T. ASTBURY) ist und durch das Dehnen zur maximalen Streckung gebracht (in den  $\beta$ -Zustand ASTBURYs versetzt) werden kann. Je nachdem, ob wir ein solches Verhalten nur bestimmten oder allen Bezirken des Chromatinabschnittes zuschreiben, *stimmt der resultierende Bauplan mit dem der Riesenchromosomen von Chironomus (als ganzes) oder aber, was nach dem quantitativ-mikroskopischen Verhalten wahrscheinlicher sein dürfte, mit dem Bau ihrer Chromomeren<sup>1</sup> überein.*

#### Zusammenfassung.

Die mit der Formumwandlung des Chromatinmaterials spermatogener Zellen von *Chara* im Laufe der Spermatogenese einhergehende Verstärkung der negativ zur Längserstreckung der Objekte gefundenen Doppelbrechung wird als ein Begleitphänomen zunehmender Entquellung erkannt. Die den reifen Spermatozoiden entnommenen Chromatinabschnitte von gleichfalls negativer Doppelbrechung müssen als maximal entquollen gelten. Bei mikrurgischem Dehnen dieser Abschnitte resultiert eine eigentümliche *Kurve der ansteigenden Anisotropie*, welche auf eine anfängliche *maximale Ausrichtung der Nucleinsäure-Komponente* und auf eine nachfolgende *Entfältelung der Eiweißgrundlage* schließen läßt. Bei Einwirken *kontraktionsauslösender Mittel* entspricht jener vielleicht die elastische Kontraktion der Objekte, letzterer eine plastische Zusammenziehung. (Die vergleichsweise experimentell gedehnten isotropen Spermatidenkerne von *Paludina* haben wenigstens in einigen Fällen ein völlig entsprechendes Verhalten ergeben.)

Das Chromatin der Spermatozoiden von *Chara* (und der tierischen Spermatidenkerne) stellt einen eigentümlichen *Vorbereitungszustand zur Teilung* dar; daraus erklären sich der hohe Orientierungsgrad der Nucleinsäure-Komponente und wahrscheinlich auch der Eiweißgrundlage und die Vergleichbarkeit mit dem leptonischen Bauplan der Riesenchromosomen larvaler Speicheldrüsen. Vermutet wird ein *Bauplan analog dem der Chromomeren* jener Riesenchromosomen, d. h. ein orientierter Einbau der Nucleinsäureketten in ebenfalls parallelisierte Fadenmolekeln der Polypeptide.

<sup>1</sup> Vgl. PFEIFFER: Chromosoma 2, 83 (1941); s. auch dort Abb. 3.

